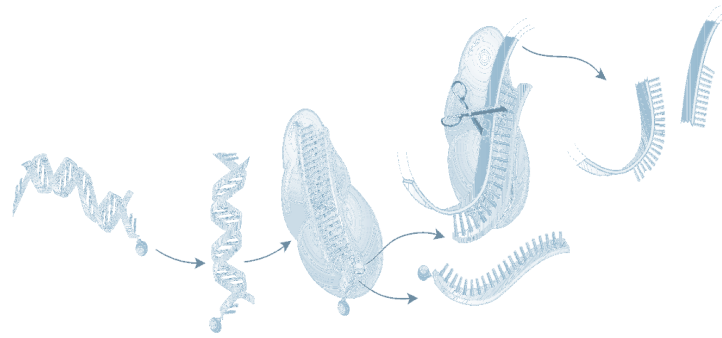


Chemische Modifikation von siRNAs zur Verbesserung der zellulären Aufnahme



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Andrea Claudia Forst

aus Förderstedt

Bayreuth, 2006

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Oktober 2003 bis November 2006 in der Alnylam Europe AG in Kulmbach unter Leitung von Dr. Roland Kreutzer durchgeführt. Die Leitung dieser Arbeit an der Universität Bayreuth wurde von Prof. Dr. Gerhard Krauss übernommen.

Einreichen der Dissertation: 29. November 2006

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 27. März 2007

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Krauss (Universität Bayreuth)

Zweitgutachter: Dr. R. Kreutzer (Alnylam Europe AG)

Vorsitzender: Prof. Dr. K.H. Seiffert (Universität Bayreuth)

Prof. Dr. W. Schumann (Universität Bayreuth)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Roland Kreutzer, Dr. Stefan Limmer sowie Dr. Hans Peter Vornlocher für die freundliche Aufnahme in die Alnylam Europe AG und die interessante und vielseitige Themenstellung. Ebenso sei Andreas Bossko für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit gedankt.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Gerhard Krauss für die Übernahme der Leitung dieser Arbeit an der Universität Bayreuth.

Besondere Erwähnung verdienen Dr. Philipp Hadwiger und Dr. Anke Geick für die Betreuung und stetige Unterstützung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt...

...allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Alnylam Europe AG für das herzliche und offene Arbeitsklima, welches diese Firma zu etwas Besonderem macht.

...Astrid, Harald und Frank für die Einführung in die RNA-Synthese und die unendlichen Weiten der HPLC.

...Doris, Stephan, Günther und Ingo für das Messen und Analysieren meiner nicht immer ganz eindeutigen Proben.

...Petra, Nadine und Sandra für die stetige Hilfsbereitschaft und Weitergabe ihrer Erfahrungen beim Erlernen neuer Techniken, im Besonderen Petra für die unterhaltsamen Geschichten aus Nurn und Umgebung, Nadine und Christine für die „kleinen Pausen zwischendurch“ sowie Sandra und Brigitte für das Teilen von Freud und Leid, aber vorallem Süßigkeiten jeglicher Art.

...Birgit und Anke für hilfreiche Ideen bei der Umsetzung einiger Experimente.

...Kerstin für das stundenlange Korrekturlesen dieser Arbeit, besonders aber für die netten Gespräche und Ratschläge.

...Matthias ebenfalls für das Lesen meiner Arbeit und die fruchtbaren Erkenntnisse über Rezeptor-vermittelte Aufnahme und endosomale Freisetzung.

...Rainer für die stetige Diskussionsbereitschaft und die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie.

...Kerstin Hannemann für das Messen meiner NMR-Spektren.

Vielen Dank auch an meinen Freund Oli, der mir während der gesamten Zeit immer wieder Mut zugesprochen und mir neue Kraft gegeben hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung dies alles nicht möglich gewesen wäre.

INHALT

1 EINLEITUNG	1
1.1 RNA-INTERFERENZ	1
1.1.1 ENTDECKUNG DER RNA-INTERFERENZ	1
1.1.2 MECHANISMUS DER RNA-INTERFERENZ	3
1.2 THERAPEUTISCHE ANWENDUNG VON siRNAs	9
1.3 CHEMISCHE MODIFIKATIONEN VON NUKLEINSÄURE-BASIERENDEN WIRKSTOFFEN ZUR VERBESSERTEN ZELLAUFNAHME	11
1.4 APOLIPOPROTEIN B ALS ENDOGENES ZIELPROTEIN FÜR DEN EINSATZ VON siRNAs	16
1.5 ZIELSETZUNG	18
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 ORGANISCH-CHEMISCHE SYNTHESE	20
2.1.1 REAGENZIEN, CHEMIKALIEN UND GERÄTE	20
2.1.2 CHEMISCHE SYNTHESE VON LITHO (3)	21
2.1.2.1 Synthese von 5 β -Cholansäure-(di-n-decyl)-amid (2)	21
2.1.2.2 Synthese von 3 α -[(2-Cyanethoxy)- <i>N,N</i> -diisopropylaminophosphanyloxy]-5 β -cholansäure-(di-n-decyl)-amid (3)	21
2.1.3 HERSTELLUNG VON CHOL (6)	23
2.1.3.1 Synthese von (<i>N</i> -6-Hydroxyhexyl)-carbamidsäurecholesterylester (5)	23
2.1.3.2 Synthese von [6-(2-Cyanethoxy)- <i>N,N</i> -diisopropylaminophosphanyloxy]- <i>N</i> -hexyl]-carbamidsäurecholesterylester (6)	23
2.1.4 SYNTHESE VON BETULIN (9)	24
2.1.4.1 Synthese von 28-[4,4'-Dimethoxytriphenylmethoxy]-lup-20(29)-en-3 β -ol (8)	24
2.1.4.2 Synthese von 28-[4,4'-Dimethoxytriphenylmethoxy]-3 β -[(2-cyanethoxy)- <i>N,N</i> -diisopropylaminophosphanyloxy]-lup-20(29)-en (9)	25
2.1.5 SYNTHESE VON 3BCHOL (11)	26
2.1.6 MÖGLICHKEIT A ZUR SYNTHESE VON GAL (18)	26
2.1.6.1 Synthese von 1- <i>O</i> -[(2 <i>Z</i>)-4-Benzylxybut-2-enyl]-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (13)	26
2.1.6.2 Synthese von 1- <i>O</i> -(2 <i>Z</i>)-4-Benzylxybut-2-enyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (14)	27

2.1.6.3 Synthese von 1- <i>O</i> -[(2 <i>Z</i>)-4-Benzyl oxybut-2-enyl] -6- <i>O</i> -(4-methoxy-triphenylmethyl)- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (15)	28
2.1.6.4 Synthese von 1- <i>O</i> -[(2 <i>Z</i>)-4-Benzyl oxybut-2-enyl] -6- <i>O</i> -(4-methoxy-triphenylmethyl)-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (16)	28
2.1.6.5 Synthese von 1- <i>O</i> -(4-Hydroxybutyl) -6- <i>O</i> -(4-methoxytriphenylmethyl)- 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β (α)- <i>D</i> -galaktopyranosid (17)	29
2.1.6.6 Synthese von 1- <i>O</i> -{4-[(2-Cyanethoxy)- <i>N,N</i> -diisopropylaminophosphanyloxy]-butyl}-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β (α)- <i>D</i> -galaktopyranosid (18)	29
2.1.7 MÖGLICHKEIT B ZUR SYNTHESE VON GAL (18)	30
2.1.7.1 Synthese von 1- <i>O</i> -(4-Benzyl oxybutyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (13a)	30
2.1.7.2 Synthese von 1- <i>O</i> -(4-Benzyl oxybutyl)- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (14a)	30
2.1.7.3 Synthese von 1- <i>O</i> -(4-Benzyl oxybutyl) -6- <i>O</i> -(4-methoxytriphenylmethyl)- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (15a)	31
2.1.7.4 Synthese von 1- <i>O</i> -(4-Benzyl oxybutyl) -6- <i>O</i> -(4-methoxytriphenylmethyl)-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (16a)	31
2.1.7.5 Synthese 1- <i>O</i> -(4-Hydroxybutyl) -6- <i>O</i> -(4-methoxytriphenylmethyl)- 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (17)	31
2.1.7.6 Synthese von 1- <i>O</i> -{4-[(2-Cyanethoxy)- <i>N,N</i> -diisopropylamino-phosphanyloxy]-butyl}-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (18)	32
2.1.8 MÖGLICHKEIT C ZUR SYNTHESE VON GAL 18	32
2.1.8.1 Synthese von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -Galaktopyranose (19)	32
2.1.8.2 Synthese von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- <i>D</i> -galaktopyranosyltrichloracetimidat (20)	33
2.1.8.3 Synthese von 1- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxybutyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (21)	33
2.1.8.4 Synthese von 1- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxybutyl)- β - <i>D</i> -galakto pyranosid (22)	34
2.1.8.5 Synthese von 1- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxybutyl)-6- <i>O</i> -(4-methoxy-triphenylmethyl)- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (23)	34
2.1.8.6 Synthese von 1- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -Butyldimethylsilyloxybutyl)-6- <i>O</i> -(4-methoxy-triphenylmethyl)-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (24)	34
2.1.8.7 Synthese von 1- <i>O</i> -(4-Hydroxybutyl) -6- <i>O</i> -(4-methoxytriphenylmethyl)- 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (17)	35

2.1.8.8 Synthese von Synthese von 1- <i>O</i> -{4-[(2-Cyanethoxy)- <i>N,N</i> -diisopropyl-aminophosphanyloxy]-butyl}-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -galaktopyranosid (18)	36
2.1.9 SYNTHESE EINES GALNAC-PHOSPHORAMIDITS	36
2.1.9.1 Umsetzung von <i>N</i> -Acetylgalaktosamin mit 4- <i>cis</i> -Benzyloxy-buten-1-ol	36
2.2 RNA-SYNTHESE	36
2.2.1 RNA-FESTPHASENSYNTHESE	36
2.2.2 RNA-ENTSCHÜTZUNG	41
2.2.3 POSTSYNTHETISCHE KOPPLUNGEN	43
2.2.4 MALDI-TOF UND LC-MS	44
2.2.5 ANALYTISCHE HPLC	46
2.2.6 PRÄPARATIVE HPLC	46
2.2.7 ENTSALZUNG	47
2.2.8 UV-SPEKTROMETRISCHE BESTIMMUNG DER RNA-KONZENTRATION	48
2.2.9 ANNEALING-PROTOKOLL ZUR HERSTELLUNG VON RNA-DOPPELSTRÄNGEN	49
2.2.10 ÜBERSICHT DER VERWENDETEN RNA-DUPLEXE	49
2.2.11 NATIVE POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	58
2.3 BIOCHEMISCHE EXPERIMENTE	59
2.3.1 ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN	59
2.3.1.1 Zelllinien	59
2.3.1.2 Kultur der Zelllinien HuH7 und MH7777A	60
2.3.1.3 Auftauen von Zelllinien	61
2.3.1.4 Einfrieren von Zellkulturen	61
2.3.1.5 Transfektionsexperimente	62
2.3.1.6 Inkubationsexperimente (ohne Transfektionshilfe)	63
2.3.1.7 Bestimmung der Zytotoxizität von siRNAs	64
2.3.1.8 Aufnahmestudien mit fluoreszenz-markierter siRNA	65
2.3.2 NACHWEIS VON M-RNA MITTELS B-DNA	66
2.3.2.1 Theoretischer Hintergrund	66
2.3.2.2 Praktische Durchführung	67
2.3.3 ARBEITEN MIT PROTEIN	72
2.3.3.1 Gewinnung des Gesamtproteins aus einer Zellkultur	72
2.3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	72
2.3.3.3 Elektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen	73
2.3.3.4 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)	74

2.3.3.5 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	75
2.3.3.6 Nachweis von Proteinen mit Hilfe des ELISA	76
3 ERGEBNISSE	80
3.1 ORGANISCH-CHEMISCHE SYNTHESE	80
3.1.1 SYNTHESE DES STEROID-DERIVATS LITHO (3)	81
3.1.2 SYNTHESE DES CHOLESTERIN-DERIVATS CHOL (6)	82
3.1.3 SYNTHESE DES LUPAN-DERIVATS BETULIN (9)	83
3.1.4 SYNTHESE DES STEROID-DERIVATS 3BCHOL (11)	84
3.1.5 SYNTHESE DES GALAKTOSE-DERIVATS GAL (18)	84
3.1.6 SYNTHESE EINES <i>N</i> -ACETYL-GALAKTOSAMIN-DERIVATS 26	89
3.2 RNA-SYNTHESE	90
3.2.1 REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON EINZELSTRANG-RNA	98
3.2.2 DARSTELLUNG VON DOPPELSTRANG-RNA	111
3.3 ANALYSE DER siRNAs IN EINER HUMANEN LEBERKARZINOMZELLINIE	111
3.3.1 POSTTRANSKRIPTIONELLE HEMMUNG DER GENEXPRESSION <i>IN VITRO</i> DURCH TRANSFEKTION DER siRNAs	112
3.3.1.1 Reduktion des ApoB Proteins	112
3.3.1.2 Reduktion der <i>apoB</i> m-RNA	113
3.3.2 POSTTRANSKRIPTIONELLE HEMMUNG DER GENEXPRESSION <i>IN VITRO</i> DURCH DIE siRNAs OHNE TRANSFEKTIONSHILFE	115
3.3.2.1 Reduktion des ApoB Proteins	115
3.3.2.2 Reduktion der <i>apoB</i> m-RNA	116
3.3.3 ANALYSE EINER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG	117
3.3.3.1 Dosis-Wirkung bei Transfektion	117
3.3.3.2 Dosis-Wirkung ohne Transfektionshilfe	119
3.3.4 ANALYSE EINER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG NACH REZEPTORAKTIVIERUNG	120
3.3.5 ZELLULÄRE AUFNAHMESTUDIEN MIT FLUORESCENZMARKIERTER siRNA	123
3.3.6 KOMPETITIONSSSTUDIEN MIT <i>N</i> -ACETYL GALAKTOSAMIN	125
3.3.7 EINFLUSS DER MODIFIKATION AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT	127
3.4 ANALYSE DER siRNAs IN EINER RATTENLEBERKARZINOMZELLINIE	127
3.4.1 POSTTRANSKRIPTIONELLE HEMMUNG DER GENEXPRESSION <i>IN VITRO</i> DURCH TRANSFEKTION UND AUFZEIGEN EINER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG	128

3.4.2 POSTTRANSKRIPTIONELLE HEMMUNG DER GENEXPRESSION <i>IN VITRO</i> OHNE TRANSFEKTIONSHILFE UND AUFZEIGEN EINER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG	129
3.4.3 ANALYSE EINER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG NACH REZEPTORAKTIVIERUNG	130
3.4.4 KOMPETITIONSTUDIEN MIT <i>N</i> -ACETYLGALAKTOSAMIN	131
3.4.5 EINFLUSS DER MODIFIKATION AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT	132
3.5 NACHWEIS DES ASIALOGLYKOPROTEIN-REZEPTORS	133
 4 DISKUSSION	 135
 4.1 VERGLEICH DER ORGANISCH CHEMISCHEN SYNTHESEVERFAHREN	 135
4.2 OPTIMIERUNG DER RNA-SYNTHESE MIT MODIFIZIERTEN SYNTHONEN	139
4.3 EIGENSCHAFTEN DER MODIFIZIERTEN siRNAs	141
4.3.1 EINFLUSS DER siRNA-MODIFIKATIONEN AUF DEN RNA-INTERFERENZEFFEKT BEI TRANSFEKTION	141
4.3.2 EINFLUSS DER 5'-SENSE MODIFIKATION AUF DEN RNA-INTERFERENZEFFEKT OHNE TRANSFEKTIONSHILFE	142
4.3.3 AUFZEIGEN EINER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG DER MODIFIZIERTEN siRNAs BEI TRANSFEKTION	144
4.3.3.1 Die siRNAs zeigen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung in der humanen Leberkarzinomzelllinie	144
4.3.3.2 Posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression mit den modifizierten siRNAs im Rattenzellsystem	145
4.3.4 DIE MODIFIZIERTEN siRNAs ZEIGEN KEINE HINWEISE AUF ZYTOTOXIZITÄT IM VERWENDETEN TESTSYSTEM	146
4.4 REZEPTOR-VERMITTELTE AUFNAHME VON GALAKTOSE-KONJUGIERTEN siRNAs IN LEBERKARZINOMZELLEN	147
4.4.1 BIOCHEMISCHE HINWEISE	147
4.4.2 NACHWEIS DES ASIALOGLYKOPROTEIN-REZEPTORS	149
4.4.3 EINFLUSS VON KALZIUM AUF DIE REZEPTOR-FUNKTION	150
4.4.3.1 Kalzium verstärkt die Wirkung der Galaktose-konjugierten siRNAs	150
4.4.3.2 Zellbiologische Hinweise auf eine gesteigerte Internalisierung der siRNAs nach Rezeptor-Aktivierung durch Kalzium	152
4.4.3.3 Charakterisierung des Einflusses von Kalzium auf die gesteigerte Rezeptor- und siRNA-Aktivität	153

4.4.4 KOMPETITION MIT <i>N</i> -ACETYLGALAKTOSAMIN	155
4.5 AUSBLICK	156
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>157</u>
<u>6 SUMMARY</u>	<u>159</u>
<u>7 ABKÜRZUNGEN</u>	<u>161</u>
<u>8 LITERATUR</u>	<u>165</u>

1 Einleitung

1.1 RNA-Interferenz

„Das pfiffige an ihrer Entdeckung ist, dass sie die Mittel der Natur selbst zur Anwendung bringt. Dies eröffnet fantastische Möglichkeiten...“, so der Sprecher des Nobelkomitees Hans Jörnvall in Stockholm über die RNA-Interferenz (FAZ online, 2006).

Im Oktober 2006 wurde der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an die Entdecker der RNA-Interferenz Andrew Z. Fire und Craig C. Mello verliehen. Im Jahr 1998 publizierten Fire und Mello ihre bahnbrechende Entdeckung im Fachjournal *Nature*, die sie an dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beobachteten (Fire et al., 1998). Die Zeitschrift *Science* würdigte im Jahr 2002 die „RNA-Interferenz als wissenschaftlichen Durchbruch des Jahres“ (Couzin, 2002). Bereits letztes Jahr wurden beide Wissenschaftler mit der höchsten deutschen Medizin-Auszeichnung, dem Paul Ehrlich- und Ludwig Darmstaedter Preis, geehrt.

Zudem konnte durch die intensive Forschungsarbeit von Thomas Tuschl und seinen Kollegen die RNA-Interferenz auch in Säugerzellen nutzbar gemacht werden (Elbashir et al., 2001). Der Wissenschaft ist somit ein Werkzeug an die Hand gegeben worden, mit dessen Hilfe die Funktion einzelner Gene ermittelt werden können, ohne aufwendige „Knock-out“ Mutanten herzustellen (Novina und Sharp, 2004; Berns et al., 2004). Des Weiteren ermöglicht diese Technologie die Entwicklung alternativer Therapien für die gezielte sequenzspezifische Hemmung von Onkogenen, viralen Infektionen und theoretisch jedem krankheitsauslösenden Protein im humanen Organismus.

1.1.1 Entdeckung der RNA-Interferenz

Bereits 1990 wurde bei der Einführung von Transgenen in purpurfarbene Petunien, anstelle einer Farbintensivierung eine vollständige Entfärbung der Blütenblätter festgestellt (Van Der Krol et al., 1990; Napoli et al., 1990; Jorgensen et al., 1996; Guo und Kemphues, 1995), die offenbar durch die „Stummschaltung“ der entsprechenden Gene hervorgerufen wurde. Auf dem Gebiet der Antisense-Technologie konnte 1995 gezeigt werden, dass der nur als Kontrolle eingesetzte

Sense Strang ebenso in der Lage war die Genexpression zu unterbinden, wie der zu diesem Zweck verwendete Antisense Strang. Unklar war, weshalb der Sense Strang mit der gleichen Sequenz wie die m-RNA die gleiche Wirkung erzielte wie der komplementäre Antisense Strang (Guo und Kemphues, 1995). Es war die Leistung von Fire und Mello dieser Beobachtung eine definierte Ursache zuzuordnen. So konnten sie zeigen, dass die gleichzeitige Gabe von Sense und Antisense Strang zu einem synergistischen Effekt führte und zu einer 100-fach höheren Inhibition der Genexpression als die Applikation von jeweils nur einem Strang (Fire et al., 1998). Durch *in situ* Hybridisierung des endogenen *mex-3* Transkripts, welches für die embryonale Entwicklung im Einzellstadium des Fadenwurms unerlässlich ist, konnten sie den Effekt doppelsträngiger RNA verdeutlichen (siehe Abb. 1.1). Es kam zu einer vollständigen Eliminierung der *mex-3* m-RNA und daher konnte keine *in situ* Hybridisierung mehr stattfinden (Abb. 1.1 d).

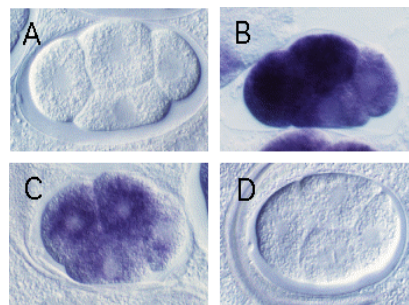


Abbildung 1.1: Gezeigt ist der *mex-3* RNA Interferenzeffekt auf den endogenen m-RNA Gehalt verschieden behandelter *C. elegans* Embryonen nach *in situ* Hybridisierung. **A:** unbehandelter Ansatz, ohne Zugabe von Sense oder Antisense Strängen. **B:** Embryo von unbehandelten Eltern mit normaler *mex 3* Expression. **C:** Embryo von Eltern, die mit *mex-3* Antisense RNA behandelt wurden. **D:** Embryo von Eltern, die doppelsträngige RNA gegen *mex 3* erhielten (Fire et al., 1998).

Die Embryonen der mit *mex-3* dsRNA behandelten Elterngeneration zeigten durch die Reduktion der *mex-3* m-RNA einen 100%igen embryonalen Arrest (Abb. 1.1 d), während 90% der Embryonen von den Eltern mit Antisense-Behandlung schlüpften (Abb. 1.1 c). Fire und Mello gaben diesem Phänomen den Namen RNA-Interferenz (RNAi) und stellten zudem die Vermutung an, dass es sich bei der RNAi um einen katalytischen Prozess handeln musste, da sie nur so die Wirkung der Sense Stränge erklären konnten (Fire et al., 1998).

Durch die Einführung synthetisch hergestellter siRNAs (21-23 Basenpaare) konnte der RNA-Interferenz-Mechanismus erstmals auch in Säugerzellen genutzt werden.

Von Tuschl und Kollegen wurde die sequenzspezifische, posttranskriptionelle Hemmung des Kernhüllproteins Lamin A/C in humanen Gebärmutterhalskrebs-Zellen (HeLa) gezeigt, ohne eine unspezifische Immunantwort auszulösen (Elbashir et al., 2001).

1.1.2 Mechanismus der RNA-Interferenz

Nach der Entdeckung der RNA-Interferenz durch Fire und Mello in *C. elegans*, konnte dieses Phänomen auch für andere Organismen beschrieben werden (Ngo et al., 1998; Lohmann et al., 1999; Sanchez und Newmark, 1999; Wargelius et al., 1999; Wianny und Zernicka-Goetz, 2000). Es schien sich um einen evolutionären Prozess zu handeln, der allen Eukaryoten gemeinsam ist (Zamore, 2001). Der als natürlicher Prozess ablaufende Mechanismus der RNAi erfolgt im menschlichen Organismus im Zytoplasma, indem die Ziel-m-RNA nach Transkription definiert geschnitten und damit die Translation verhindert wird. Der gegenwärtig angenommene Mechanismus ist in Abbildung 1.2 dargestellt und soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

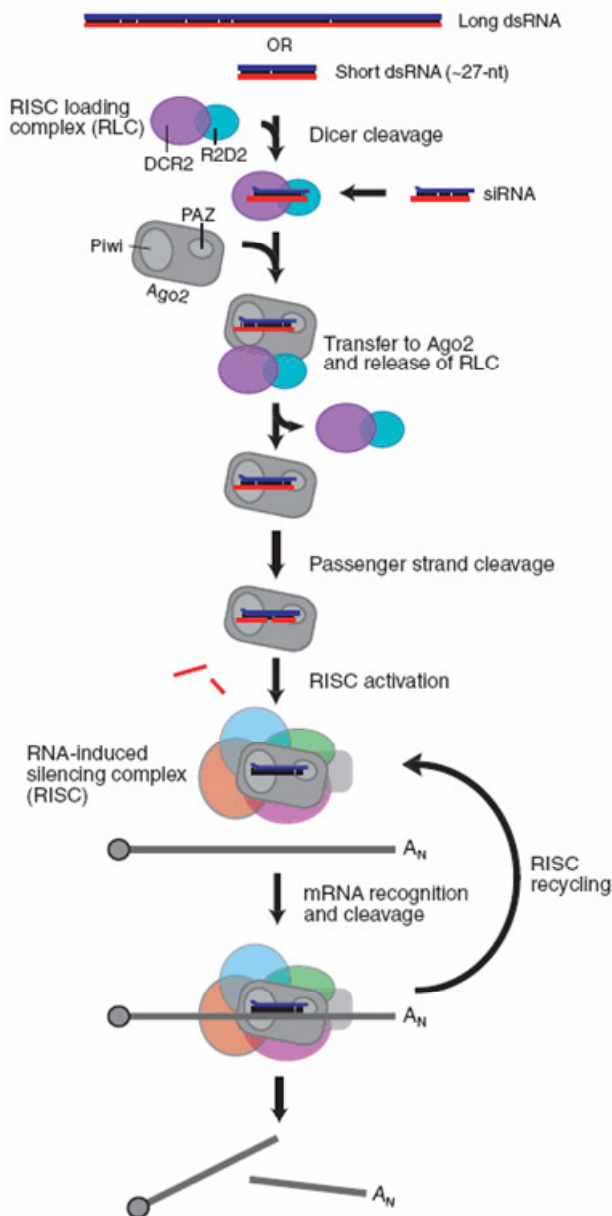


Abbildung 1.2: Gezeigt ist der aktuell angenommene RNA-Interferenzmechanismus in *Drosophila melanogaster* (Dykxhoorn und Lieberman, 2006). Durch das Enzym Dicer (DCR2), einem Mitglied der RNase III Familie, wird lange dsRNA in kurze siRNAs (21-23 Nukleotide) geschnitten. Unter Beteiligung des dsRNA-bindenden Proteins R2D2 wird der RL-Komplex (RLC - RISC Loading Complex) gebildet, welcher die Aufnahme der siRNA in den RISC (RNA-induced Silencing Complex) ermöglicht. Synthetisch hergestellte siRNA kann ebenfalls durch den RLC-abhängigen Mechanismus in den RISC aufgenommen werden, oder aber direkt an den RISC binden. Bei diesem Prozess wird die siRNA auf das Argonaut 2 Protein (Ago2) übertragen, welches eine Helikase- und Endonuklease-Aktivität besitzt. Um den RISC zu aktivieren, wird der Sense Strang (Passenger Strand) der siRNA von Ago2 gespalten und aus dem Komplex entlassen. Der Antisense Strang (Guide Strand) verbleibt im RISC und führt ihn zu einer komplementären m-RNA, welche anschließend durch die Endonuklease Ago2 definiert, 10 Nukleotide entfernt vom 5'-Ende des komplementären Antisense Strangs, geschnitten wird. Nach diesem Prozess steht der aktivierte RISC für eine erneute Erkennung einer komplementären m-RNA zur Verfügung.

Das Dicer Enzym, ein 200 kDa großes Protein, gehört zur RNase III Familie und setzt sich aus mehreren Domänen zusammen (Bernstein et al., 2001; Blaszczyk et al., 2001; Zhang et al., 2002; Zamore et al., 2000; Zhang et al., 2004). So konnten bisher eine Helikase- und eine PAZ-Domäne sowie zwei RNase III verwandte Katalysedomänen identifiziert werden. Des Weiteren wurde eine C-terminale dsRNA-bindende und eine Domäne mit unbekannter Funktion gefunden, welche als DUF283 bezeichnet wurde (Zamore et al., 2000; Provost et al., 2002; Zhang et al., 2002; Carmell und Hannon, 2004; Zhang et al., 2004).



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der primären Sequenz des Dicer-Proteins, bestehend aus einer Helikase- und PAZ-Domäne, zwei RNase III ähnlichen Domänen sowie einer ds-RNA-bindenden Domäne. Des Weiteren ist eine Domäne (DUF 283) mit unbekannter Funktion enthalten (Carmell und Hannon, 2004).

Unter Beteiligung von ATP wird lange dsRNA durch das Multidomänen-Protein Dicer in 21-23 Basenpaare umfassende „small interfering RNAs“ (siRNAs) geschnitten (Zamore et al., 2000). Diese zeichnen sich durch eine Phosphatgruppe am 5'-Ende jedes Einzelstrangs und eine Hydroxylfunktion am 3'-Ende aus (Elbashir et al., 2001). Weiterhin besitzen sie einzelsträngige Überhänge von 2 Nukleotiden am 3'-Terminus des Sense und Antisense Strangs (Elbashir et al., 2001), wie es für Spaltprodukte der RNase III Familie typisch ist (Blaszczyk et al., 2001).

Kürzlich konnte die Kristallstruktur des Dicer-Multidomänenproteins von *Giardia intestinalis*, eines flagellaten-artigen Darmparasiten, ermittelt werden, welche in Abbildung 1.4 dargestellt ist (Macrae et al., 2006).

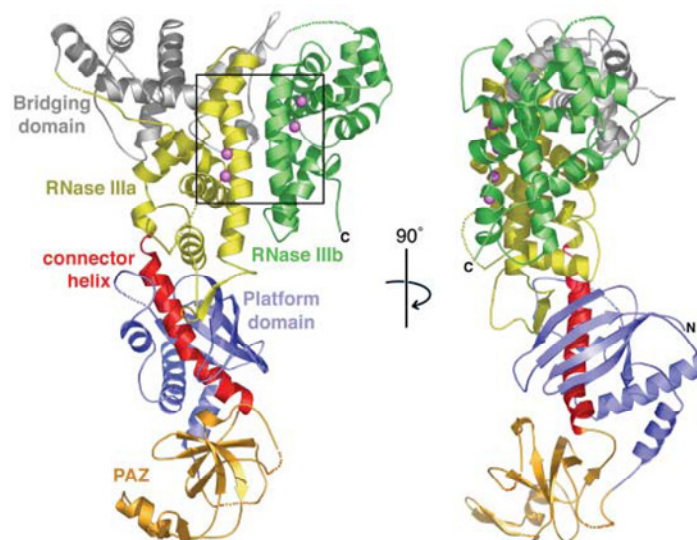


Abbildung 1.4: Kristallstruktur des Dicer-Proteins von *Giardia intestinalis* (Macrae et al., 2006). Gezeigt sind die verschiedenen Domänen des Dicers, die N-terminale Plattform (blau), die PAZ-Domäne (orange), die Verbindungshelix (rot), die beiden RNase III Domänen IIIa (gelb) und IIIb (grün) sowie eine überleitende Domäne (grau).

Betrachtet man die Kristallstruktur, zeigt sich ein gestrecktes Molekül, welches eine „Axt-ähnliche“ Konformation einnimmt. Die beiden RNase III Domänen formen das „Axtblatt“, während die PAZ-Domäne den „Griff“ bildet.

Die RNase IIIa Domäne ist direkt mit der PAZ-Domäne über eine lange α -Helix verbunden, welche von N-terminalen Resten des Proteins umgeben ist, die eine Art „Plattform“ bilden. Von der Seite betrachtet zeigt sich eine langgestreckte, zusammenhängende und ebene Oberfläche, wie in Abbildung 1.4 gezeigt (Macrae et al., 2006).

Die Struktur des Dicer-Proteins lässt einen Mechanismus vermuten, durch den die Länge der siRNA definiert wird. Die Entfernung des katalytischen Zentrums der RNase IIIa Domäne zur 3'-Überhang Bindungstasche der PAZ-Domäne beträgt etwa 65 Å, ungefähr die Länge von 25 Basenpaaren einer dsRNA. In Abbildung 1.5 ist dies schematisch dargestellt.

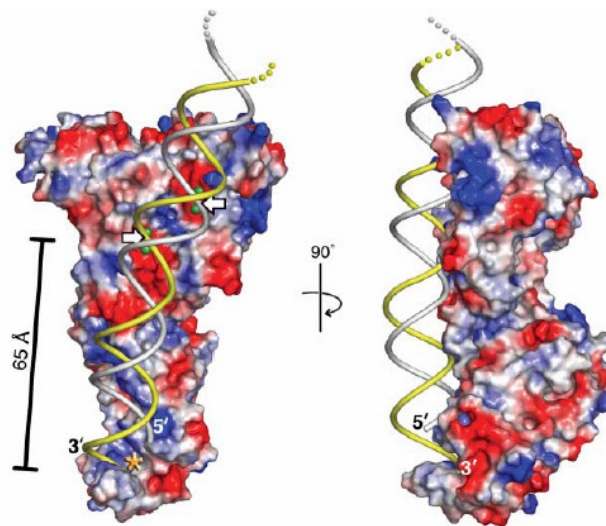


Abbildung 1.5: Modellvorstellung für die dsRNA-Prozessierung durch das Dicer-Multidomänenprotein in *Giardia* (Macrae et al., 2006). Die rot und blau gefärbten Bereiche kennzeichnen die sauren und basischen Regionen auf der Proteinoberfläche. Putative katalytische Metallionen sind grün dargestellt. Der Stern symbolisiert die Bindungstasche für den 3'-Überhang in der PAZ-Domäne.

Außerhalb der RNase III Domänen formt die sogenannte „Plattform-Domäne“ eine stark positiv geladene Oberfläche, welche direkt mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der RNA interagieren könnte. Das 3'-Ende des RNA-Duplex fällt direkt in die 3'-Überhang Bindungstasche der PAZ-Domäne, während das 5'-Ende in dem benachbarten Spalt zum Liegen kommt. Da genau 25 Nukleotide zwischen dem 3'-Ende der gebundenen Helix in der PAZ-Domäne und dem leicht spaltbaren Phosphat in der RNase III Domäne liegen, stellt der Dicer-Komplex einen molekularen Regler für die Prozessierung langer dsRNA in kurze siRNAs dar (Macrae et al., 2006).

Chemisch synthetisierte siRNAs von 21 bis 23 Nukleotiden Länge können, genauso effizient wie lange dsRNA, die Spaltung einer komplementären m-RNA induzieren (Elbashir et al., 2001).

„Small interfering RNAs“, welche vom Dicer-Protein prozessiert wurden, oder synthetisch hergestellte siRNAs werden im Anschluss effektiv durch den Multienzymkomplex RISC (RNA-induced Silencing Complex) erkannt und leiten diesen zu einer komplementären m-RNA, welche endonukleolytisch, 10 Nukleotide entfernt vom 5'-Terminus des komplementären Strangs, geschnitten wird (Park und Wu, 2004; Dykxhoorn und Novina, 2003; Joshua-Tor, 2004). Nur einer der beiden Stränge der siRNA wird in den RISC inkorporiert und führt zur Spaltung der m-RNA. Der Strang, der eine geringere thermodynamische Stabilität am 5'-Ende aufweist (Antisense Strang = Guide Strang), bleibt mit dem RISC assoziiert und hybridisiert mit der komplementären m-RNA (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003).

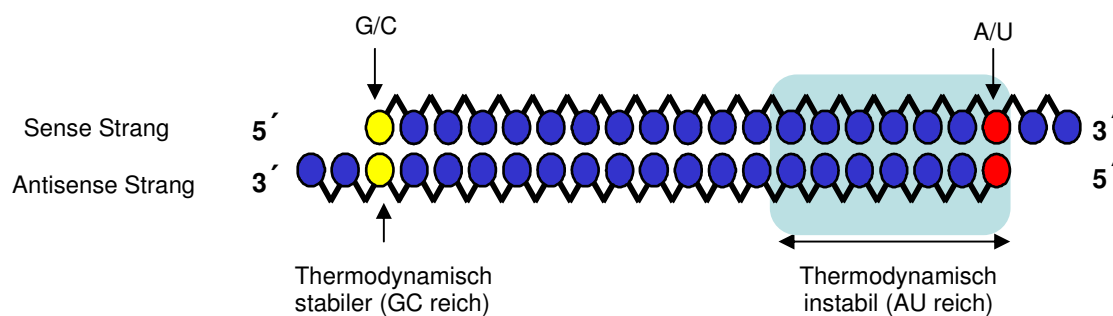


Abbildung 1.6: Kugelmodell einer synthetisierten siRNA mit einem Doppelstrang-Bereich von 19 Nukleotiden und 2 Nukleotid-Überhängen an den 3'-Enden. Das thermodynamisch instabilere Ende (5'-Ende des Antisense Strangs = Guide Strang) enthält ein A/U reiches Motiv und ist leichter durch eine Helikase zu entwenden. Dieser Strang bleibt mit dem RISC assoziiert und ist komplementär zur Ziel m-RNA (Ui-Tei et al., 2006).

Im Modellorganismus *D. melanogaster* ist dieser Prozess am besten charakterisiert (siehe Abb. 1.2). Die Einführung der siRNA in den RISC erfordert die Beteiligung des „RISC loading complex“ (RLC), welcher sich aus der siRNA, dem Dicer2 Protein und dem dsRNA-bindenden Protein R2D2 zusammensetzt (Liu et al., 2006). R2D2 bindet dabei das thermodynamisch stabilere Ende der siRNA, während das Dicer2 Protein (DCR2) das instabilere Ende bindet und somit die Asymmetrie des Mechanismus bedingt wird (Tomari et al., 2004).

Im Anschluss wird die siRNA vom Argonaut 2 Protein (Ago2, auch Slicer genannt) gebunden, welches die Hauptkomponente und Endonuklease des RISC darstellt (Hammond et al., 2001; Okamura et al., 2004; Rand et al., 2004). Bei diesem Prozess wird der Sense Strang (Passenger Strang) der siRNA durch Ago2 endonukleolytisch gespalten, so dass der aktivierte RISC entsteht, indem nur noch der Antisense Strang (Guide Strang) inkorporiert ist (Rand et al., 2005). Das phosphorylierte terminale 5'-Nukleotid des Einzelstrangs wird dabei in der positiv geladenen Bindungstasche der PIWI Domäne von Ago2 gebunden und steht somit zur Erkennung der komplementären m-RNA nicht mehr zur Verfügung (Ma et al., 2005a). Die Nukleotide 2-8 sind auf der Oberfläche des RISC exponiert und bilden eine Erkennungssequenz (Seed Region) für die komplementäre m-RNA (Ma et al., 2005; Lewis et al., 2005). Die Hybridisierungsregion zwischen dem „Guide“- Strang und der m-RNA formt eine typische A-Helix, welche die Spaltstelle der m-RNA beinhaltet. Diese liegt genau 10 Nukleotide vom 5'-Ende des „Guide“- Strangs entfernt und die m-RNA wird durch die katalytische Aktivität der PIWI-Domäne von Ago2 gespalten (Elbashir et al., 2001; Lingel und Sattler, 2005). Dieser Prozess erfordert Magnesium-Ionen und führt zu 5'-Monophosphat- und 3'-Hydroxyl-Termini (Martinez und Tuschl, 2004; Schwarz et al., 2004). Wurde die Ziel-m-RNA geschnitten, wird sie aus dem RISC entlassen und dieser steht für eine neue Runde der m-RNA Abbau zur Verfügung (Hutvagner und Zamore, 2002). Abbildung 1.7 zeigt die kürzlich ermittelte Kristallstruktur eines Argonaut-Proteins des thermophilen Eubakteriums *Aquifex aeolicus* (A) mit einer extern gebundenen siRNA (Yuan et al., 2006) sowie eine schematische Darstellung der Inkorporation der hybridisierten m-RNA in den Argonaut-Komplex (B) (Song et al., 2004).

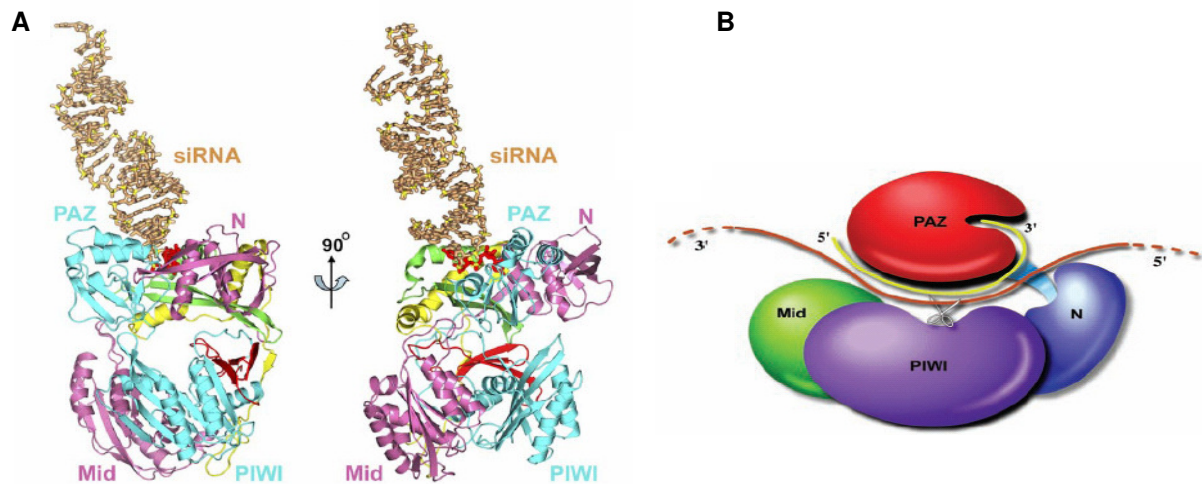


Abbildung 1.7: Modell für die endonukleolytische Spaltung der m-RNA durch das Ago-Protein (Slicer). **A:** Kristallstruktur eines Argonaut-Proteins von *Aquifex aeolicus* mit Assoziation einer extern gebundenen siRNA (beige). Die PAZ- und PIWI-Domänen sind blau gekennzeichnet, während die N- und Mid-Domänen in pink dargestellt sind. Der 2 Nukleotid-Überhang der siRNA ist rot gekennzeichnet (Yuan et al., 2006). **B:** Topologische Anordnung der vier Domänen eines Ago-Proteins des thermophilen Mikroorganismus *Pyrococcus furiosus* (Siedender Feuerball). Das 3'-Ende des „Guide strand“ der siRNA (gelb) interagiert mit der Bindungstasche der PAZ-Domäne (rot). Die basengepaarte m-RNA (braun) wird am katalytischen Zentrum der PIWI-Domäne (lila) geschnitten (Song et al., 2004).

1.2 Therapeutische Anwendung von siRNAs

Mit dem siRNA Ansatz steht eine neue Substanzklasse zur Verfügung, deren Wirkmechanismus auf einem katalytischen, natürlichen Prozess beruht. Daher besteht eine vielversprechende Chance neuartige Medikamente zu entwickeln, die selektiv die Expression von krankheitsauslösenden Genen inhibieren und somit einen Ansatz für bisher nicht therapierbare Krankheiten liefern, da siRNA Therapeutika theoretisch gegen jedes defekte Gen entwickelt werden können.

Die Einführung von langen doppelsträngigen RNAs in Säugerzellen führt über die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) zu einer unspezifischen Immunantwort (Wang und Carmichael, 2004; Bridge et al., 2003). Durch die hochstrukturierte dsRNA wird die PKR aktiv und phosphoryliert den für die Translation notwendigen Faktor *eIF2 α* . Dies führt zur Blockierung der Proteinbiosynthese und somit zum Zelltod. Durch die Einführung von synthetisch hergestellten siRNAs (21-23 Nukleotide) konnte dieser Abwehrmechanismus umgangen werden (Elbashir et al., 2001). Seit der Entdeckung von Elbashir und Kollegen gelten synthetisch hergestellte und sequenzoptimierte

siRNAs als neuer Hoffnungsträger unter den auf Nukleinsäuren basierenden Therapeutika. In verschiedenen *in vitro* Experimenten war die siRNA Technologie anderen Nukleinsäureverbindungen, die ebenfalls eine posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression bewirken sollen, wie Antisense Oligodesoxynukleotide oder Ribozyme, deutlich überlegen (Brantl, 2002; Scherer und Rossi, 2003; Hannon und Rossi, 2004).

So ist die Entwicklung von Therapeutika gegen viele verschiedene Krankheiten denkbar. Es wurde bereits gezeigt, dass RNAi gegen Krebs (Zhang et al., 2003; Scherr et al., 2003), kardiovaskuläre Erkrankungen wie erhöhte Blutfettwerte (Soutschek et al., 2004) oder Bluthochdruck, neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer (Miller et al., 2004), Chorea Huntington und Parkinson sowie verschiedene Viruserkrankungen z.B. HIV (Martinez et al., 2002; Novina et al., 2002; Stevenson, 2003), Hepatitis B (McCaffrey et al., 2003) und Hepatitis C (Randall et al., 2003; McCaffrey et al., 2002; Zamore und Aronin, 2003) und Influenza A (Ge et al., 2004) erste vielversprechende Ansätze lieferte. So konnte im Jahr 2004 von Wissenschaftlern der Alnylam Europe AG gezeigt werden, dass die posttranskriptionelle Hemmung des endogen exprimierten Apolipoprotein B 100 mit Hilfe der RNA-Interferenz zur Veränderung des Phänotyps *in vivo* führt und eine Senkung verschiedener Blutfettwerte erreicht werden konnte (Soutschek et al., 2004). Des Weiteren wurde eine spezifische Reduktion von Cholesterin mit SNALP-formulierten (Stable–Nucleic-Acid-Lipid-Particles) siRNAs in nicht-humanen Primaten erzielt (Zimmermann et al., 2006).

Auch erste klinische Versuche zeigten bereits Erfolge. Die Unternehmen SIRNA Pharmaceuticals und ACUITY Pharmaceutical setzten Therapeutika auf RNAi-Basis gegen altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ein (Adams, 2005). Darüber hinaus konnte Alnylam Pharmaceuticals vor kurzem in einer ersten klinischen Studie den erfolgreichen Einsatz von synthetisch hergestellten siRNAs gegen den Respiratorischen Syncytial Virus (RSV) im Hinblick auf Sicherheit, Verträglichkeit und Pharmakokinetik zeigen (www.alnylam.de).

1.3 Chemische Modifikationen von Nukleinsäure-basierenden Wirkstoffen zur verbesserten Zellaufnahme

Die effektive Aufnahme des Wirkstoffs ist, auf Grund der negativen Ladung und des hohen Molekulargewichts der siRNA, eines der größten Hindernisse bei der Entwicklung von RNAi-basierenden Therapeutika. Eine passive Permeation der Zellmembran ist daher durch die genannten Eigenschaften ausgeschlossen. Die Entwicklung eines zell- und gewebespezifischen Wirkstofftransports würde einen großen Schritt in Richtung der klinischen Anwendung darstellen (Sioud, 2004).

In der Antisense-Forschung wurden bereits zahlreiche Untersuchungen von chemisch modifizierten Oligodesoxynukleotiden, hinsichtlich ihrer zellulären Aufnahme, gemacht. Abbildung 1.8 gibt einen Überblick der bisher angewendeten Strategien, die Zellmembran zu überwinden und Antisense-Moleküle bzw. siRNAs erfolgreich in die Zelle zu transportieren (Dykxhoorn und Lieberman, 2006).

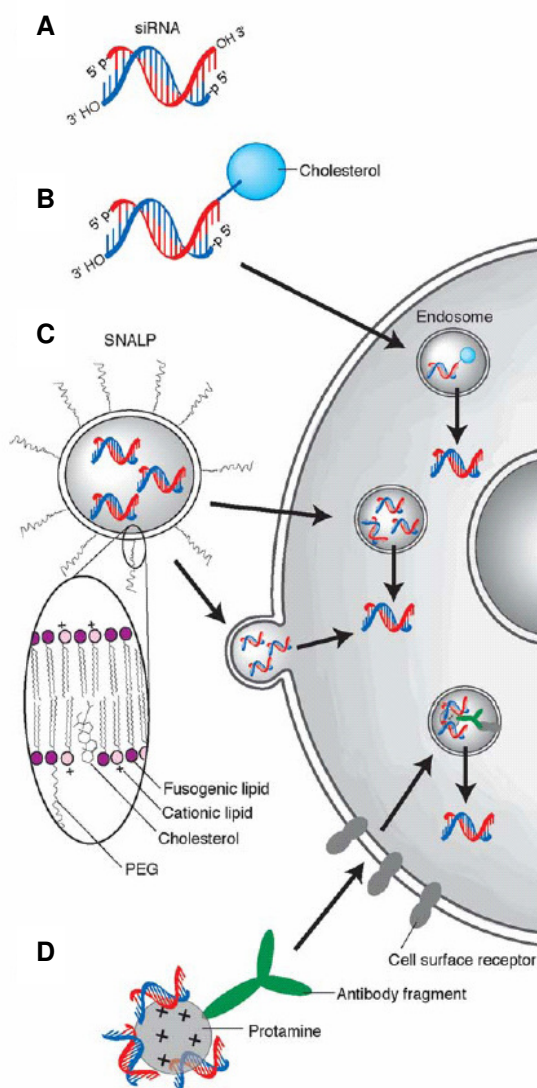


Abbildung 1.8: Strategien zur systemischen Applikation von siRNAs. **A:** Schematische Darstellung eines natürlichen siRNA Moleküls mit dem charakteristischen 19-mer Duplex und einem 2 Nukleotid-Überhang an den 3'-Enden und phosphorylierten 5'-Termini. **B:** Die Konjugation von Cholesterin an das 3'-Ende des Sense Strangs erhöht die Retentionszeit der siRNA in der Blutzirkulation durch Bindung an Low Density Lipoproteine (LDL) und Albumin. Des Weiteren wurde eine definierte Rezeptor-vermittelte Aufnahme für Cholesterin beschrieben (Krieg et al., 1993b; de Smidt et al., 1991a). **C:** Die „Verpackung“ von siRNAs in SNALPs (Stable Nucleic Acid Lipid Particles) erhöht ebenfalls die Retention im Blut und führt zu einer Aufnahme in Maushepatozyten. **D:** Die Kombination aus Nukleinsäure und Protamin, sowie die Spezifität eines Antikörpers, also die Konstruktion eines Antikörper-Protamin-Fragments, welches nicht-kovalent an die siRNA gebunden werden kann, ermöglicht die Aufnahme der siRNA in Zellen, welche den Rezeptor für diesen Antikörper exprimieren (Dykxhoorn und Lieberman, 2006).

Eine Variante zur Aufnahme von Oligonukleotiden ist die systemische Applikation durch lipophile Carrier wie kationische Lipide und Polymere (Templeton, 2002; Sorensen et al., 2003). Dabei wurde jedoch nur wenig lipidformulierte siRNA von den Zellen aufgenommen (Safinya, 2001; Szoka Jr. et al., 1997) oder aber die kationischen Lipide wurden für unerwartete Nebeneffekte verantwortlich gemacht (Ma et al., 2005).

Ein anderer Ansatz ist die Konjugation von Carriermolekülen an die siRNA. So wurden bereits in der Antisense-Technologie eine Reihe von Konjugaten synthetisiert, welche die zelluläre Aufnahme der Oligodesoxynukleotide verbessern sollten (Manoharan, 2002).

Für den Eintritt in die Zelle stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, so ist eine Internalisierung über unspezifische Endozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose oder direkte Zellpermeation denkbar. Wenn die siRNAs sich erst einmal im Zytoplasma oder die Antisense Oligodesoxynukleotide im Zellkern befinden, sind sie in der Lage, eine posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression zu bewirken. Da sowohl siRNAs, als auch Antisense-Moleküle aufgrund ihres Phosphatrückgrats negativ geladen und damit hydrophile Strukturen sind, ist eine Annäherung an die lipophile Zellmembran erschwert. Die Eliminierung der negativen Ladung allein führt jedoch auch nicht zu einer Aufnahme ins Zytoplasma, wie bereits mit Methylphosphonaten und PNA-Molekülen (Peptide Nucleic Acid) gezeigt werden konnte (Manoharan, 2002). Abbildung 1.9 gibt einen Überblick über verschiedene Modifikationen des Zucker-Phosphatrückgrats und eine Darstellung eines PNA-Moleküls.

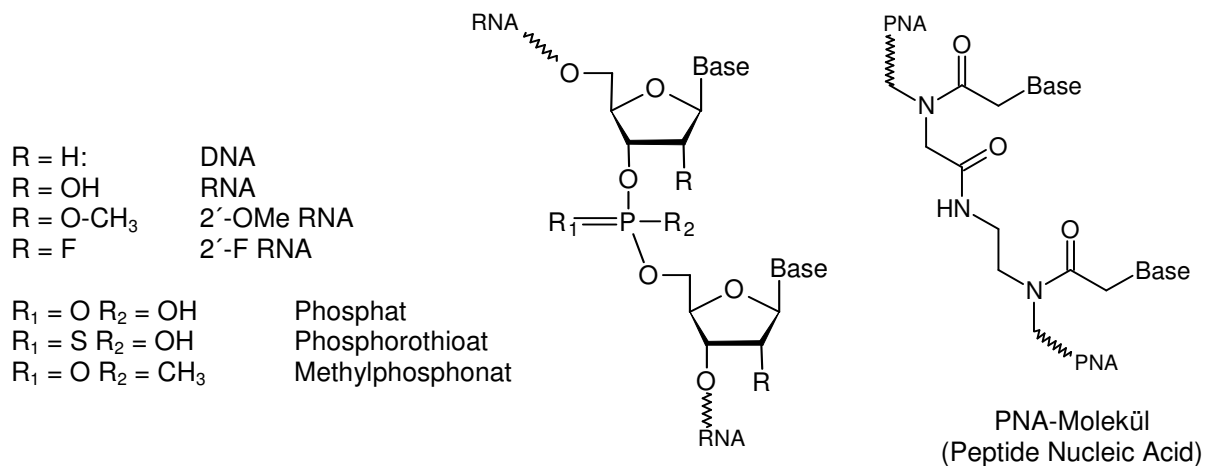


Abbildung 1.9: Chemische Darstellung der bisherigen Modifikationen des Zucker-Phosphatrückgrats, sowie eines PNA-Moleküls (Peptide Nucleic Acid) (Manoharan, 2002).

Eine weitere Möglichkeit ist die Konjugation von hydrophoben Molekülen, um die Lipophilie des Gesamtmoleküls zu erhöhen. So wurden verschiedene Gruppen an Antisense Oligodesoxynukleotide gekoppelt und hinsichtlich ihrer Membranpermeabilität untersucht (Manoharan, 2002). Das am umfangreichsten charakterisierte Molekül ist das Cholesterin, welches in den letzten 15 Jahren von mehreren Gruppen intensiv untersucht wurde (Letsinger et al., 1989; de Smidt et al., 1991; Krieg et al., 1993). Es wurde bereits 1996 die Reduktion des MDR-assoziierten P-Glykoproteins mit Hilfe eines 5'-Cholesterin gekoppelten Antisense Oligodesoxynukleotids gezeigt (Manoharan, 2002). Auch in der siRNA Forschung konnten Cholesterin-konjugierte Moleküle erfolgreich zur Hemmung der Genexpression eingesetzt werden. Eine 5'-Cholesterin-gekoppelte siRNA bewirkte die Reduktion des β -Galaktosidase-Reportergens *in vitro* in humanen Hepatozyten (Lorenz et al., 2004). Darüber hinaus ließ sich auch *in vivo* von Soutschek und Kollegen (Soutschek et al., 2004) die Hemmung der Expression des endogenen ApoB Proteins mit einer 3'-Cholesterin-modifizierten siRNA zeigen und somit den Cholesterin-Gehalt im Blut herabsetzen. Andere hydrophobe Konjugate wurden ebenfalls hinsichtlich ihres inhibitorischen Effekts und der zellulären Aufnahme untersucht. Adamantan-, Pyren-, Eicosansäure- und C₁₆-Glycerin-Oligodesoxynukleotide wurden gegen das in Mäusen exprimierte interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) eingesetzt (Manoharan et al., 1995). Des Weiteren wurden langkettige Alkylgruppen an Antisense Moleküle gebunden und eine Reduktion der viralen Proteine des Vesikulären Stomatitis Virus und des HI-Virus

beobachtet (Shea et al., 1990; MacKellar et al., 1992). Speziell für die Aufnahme in Leberzellen wurden mit Harnsäurederivaten-modifizierte Antisense Oligos eingesetzt (Kramer et al., 1992), um z.B. die Expression von Hepatitis C Proteinen zu inhibieren (Lehmann und Engels, 2001). Ebenso konnte für Terpenalkohole, wie Geraniol, eine Zellaufnahme und Reduktion des Herpes Simplex Virus 1 gezeigt werden (Manoharan, 2002).

Kationische Modifikationen, sowie konjugierte Polyamine stellen durch ihre guten Zellpermeationsfähigkeiten eine weitere Möglichkeit zur Überwindung der Zellmembran dar (Godzina et al., 1999). So wurden verschiedene Konjugationen in der Antisense Technologie eingesetzt, z.B. Spermin- und Spermidinverbindungen, Aminopropyl-, Diaminopropyl- oder Imidazol-Konjugate (Manoharan, 2002).

Auch kurze zellpenetrierende Peptide sind ein viel versprechender Ansatz, da sie offenbar die Fähigkeit besitzen, große, polare Moleküle durch die Zellmembran zu transportieren (Ho et al., 2001; Astriab-Fisher et al., 2000; Antopolsky et al., 1999; Schwarze et al., 2000). Beispiele dieser Gruppe sind eine 13 Aminosäuren lange Sequenz des HIV Tat Proteins (Jarver und Langel, 2004; Mae und Langel, 2006; Schwarze et al., 1999) eine Sequenz des Antennapedia Proteins (Ant, 16 Aminosäuren) aus *Drosophila* (Pooga et al., 1998) und das Transportan Peptid (Kilk et al., 2005; Brooks et al., 2005). So konnten PNA-Oligodesoxyonukleotide, welche mit der Ant-Sequenz modifiziert waren, in neuronale Zellen aufgenommen werden (Kilk et al., 2004). Ebenso wurden Oligodesoxynukleotide mit konjugierten Tat- und Ant-Sequenzen in Tumorzellen internalisiert und zeigten eine Reduktion des MDR-1 assoziierten P-Glykoproteins (Astriab-Fisher et al., 2000). Auch Transportan-modifizierte Antisense Sequenzen ermöglichten einen Transport ins Zellinnere und eine Inhibition des Galanin-Rezeptors *in vivo* (Pooga et al., 1998). In der Folgezeit wurden eine Reihe von Peptid-Konjugaten synthetisiert, welche die Fähigkeit zur Membranpermeation besaßen (Brooks et al., 2005; Albertshofer et al., 2005; Turner et al., 2005a; Turner et al., 2005b; Oehlke et al., 2002; Gait, 2003; Simeoni et al., 2003). Unter Anderem stellten sich auch Oligo-Arginin-Peptide als Transportmoleküle für Oligonukleotide heraus (Rothbard et al., 2002; Vives und Lebleu, 1997).

Da Zellen und Gewebe spezifische Transportsysteme für Nährstoffe wie Vitamine, Aminosäuren und Zucker besitzen, stellt die Rezeptor-vermittelte Aufnahme eine interessante und alternative Möglichkeit des Transports von Oligonukleotiden in die Zelle dar.

Auch hier wurden bereits verschiedene Ansätze in der Antisense-Forschung evaluiert (Manoharan, 2002). Die Konjugation von Folsäure an das 3'-Ende von Oligodesoxynukleotiden führte zu einer definierten Aufnahme in Zellen, welche den Folsäure-Rezeptor überexprimierten. Allerdings wurde die Aktivität dieser Moleküle durch die geringe Kapazität des Rezeptors limitiert (Wang et al., 1995; Li et al., 1998). Auch für siRNAs, welche mit einem Komplex aus Polyethylenimin, Polyethylenglykol und Folsäure formuliert wurden, konnte eine Internalisierung in humane Gebärmutterhalskrebs-Zellen *in vitro* gezeigt werden (Kim et al., 2006). Vitamin E-modifizierte Antisense-Moleküle konnten ebenfalls in Darmzellen aufgenommen werden, jedoch wurde dieser Effekt nur auf die Erhöhung der Lipophilie zurückgeführt, da andere hydrophobe Konjugate eine ähnliche Aufnahme zeigten (Moore et al., 1997). Hangeland und Kollegen zeigten 1995, dass die Konjugation von verzweigten *N*-Acetylgalaktosamin-Strukturen, welche über ein Tripeptid an Oligodesoxynukleotide gekoppelt waren, eine 40-fache Steigerung der Aufnahme in humane Hepatozyten bewirkte (Hangeland et al., 1995). Unter Verwendung des gleichen Liganden wurde mit Phosphorothioat-modifizierten Oligodesoxynukleotiden eine 90%ige Reduktion des *Hepatitis B Virus* in humanen Leberzellen gezeigt (Duff et al., 2000). Eine erhöhte Aufnahme von Oligodesoxynukleotiden nach Glykokonjugation in das Leberparenchym konnte auch von Biessen und Kollegen beschrieben werden. Dabei wurden verzweigte Galaktose-modifizierte Antisense-Moleküle *in vivo* getestet und es konnte im Vergleich zu den unkonjugierten Molekülen eine 60-fache Steigerung der Aufnahme in die Rattenleber beobachtet werden (Biessen et al., 2000; Biessen et al., 1999; Rensen et al., 2001). Für diese definierte Aufnahme wurde der Asialoglykoprotein-Rezeptor verantwortlich gemacht, dessen eigentliche Funktion in der Entfernung von desialierten Proteinen aus dem Blutkreislauf besteht (Biessen et al., 1999; Biessen et al., 2000; Rensen et al., 2001; Karinaga et al., 2006).

Trotz all dieser Ansätze stellt die gezielte Ablieferung des Wirkstoffs im richtigen zellulären Kompartiment immer noch den limitierenden Faktor beim Einsatz von Nukleinsäure-basierenden Therapeutika dar.

1.4 Apolipoprotein B als endogenes Zielprotein für den Einsatz von siRNAs

Das Apolipoprotein B, welches herkömmlichen Therapien wie kleinen Molekülen (small molecules drugs) oder Protein-basierenden Therapeutika bisher nicht zugänglich war, wurde als ein potentiell, klinisch relevantes Ziel für den Einsatz von siRNA-Molekülen ausgewählt.

Apolipoprotein B (ApoB), spielt eine unverzichtbare Rolle im Aufbau von Lipiden, einschließlich Triglyzeriden und Cholesterin. Dies beinhaltet eine Reihe von Funktionen, wie die Aufnahme und Weiterleitung von Lipiden bis hin zur Regulation des Gehalts an zirkulierenden Lipoproteinen. Ebenso wichtig ist seine Funktion beim intravaskulären Transport und der Rezeptor-vermittelten Aufnahme verschiedener Lipoproteine (Davidson und Shelness, 2000). ApoB ist der Ligand für den LDL-Rezeptor und essentiell für die Bildung von Low Density Lipoproteinen (LDLs) und Very Low Density Lipoproteinen (VLDLs) im Cholesterin-Metabolismus (Burnett und Barrett, 2002).

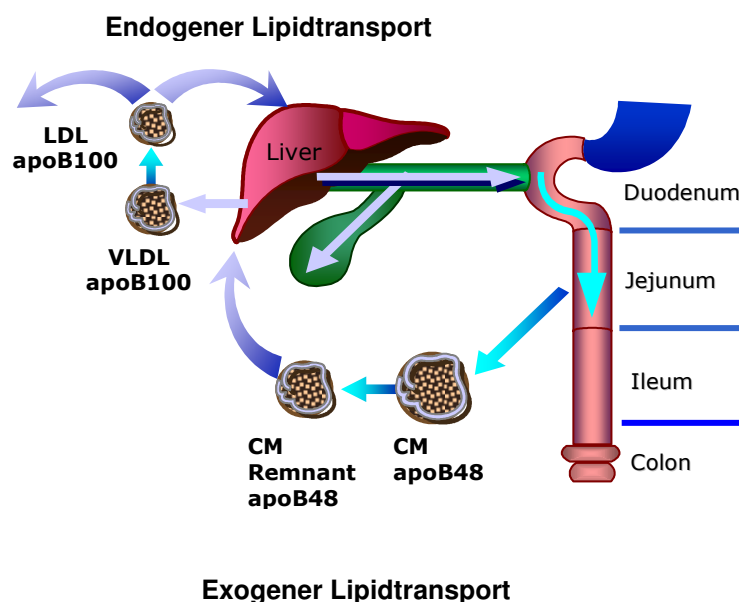


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des exogenen und endogenen Lipidtransports. ApoB Isoformen spielen eine wichtige physiologische Rolle beim Transport von LDL- und VLDL- Partikeln, sowie Chylomikronen (CM).

Abbildung 1.11 zeigt eine schematische Darstellung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme eines LDL-Partikels. Durch die Bindung von ApoB an den LDL-Rezeptor kommt es zur Internalisierung des Partikels. Nach Rezeptorregeneration verschmilzt der Partikel mit dem Lysosom und wird im sauren Milieu zerstört. Das freie Cholesterin wird ins Zytoplasma entlassen.

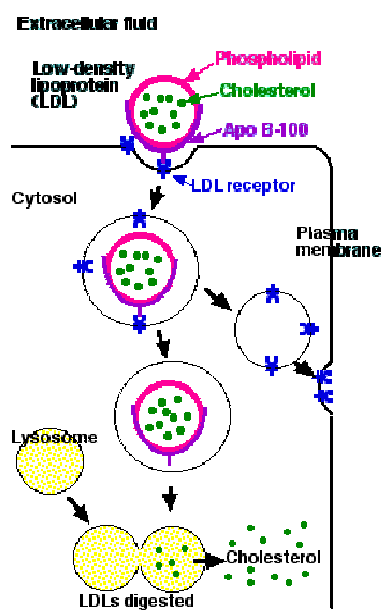


Abbildung 1.1: Darstellung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme eines LDL-Partikels über den LDL-Rezeptor. Der mit Cholesterin beladene Partikel wird über die spezifische Bindung von ApoB an den LDL-Rezeptor durch Abschnürung eines Vesikels internalisiert. Im Zytoplasma wird der Rezeptor wieder regeneriert und verschmilzt erneut mit der Zellmembran. Somit steht er für eine weitere Aufnahme zur Verfügung. Der Vesikel mit dem LDL-Partikel geht im Zytoplasma eine Fusion mit dem Lysosom ein und durch die Veränderung des pH Wertes zum Sauren wird der Vesikel lysiert und das freie Cholesterin ins Zytoplasma entlassen

Der Serumgehalt von ApoB, LDL und Cholesterin korreliert signifikant mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen der Herzkranzgefäße. Des Weiteren wurde eine verminderte Anzahl von funktionsfähigen LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche als Basis für familiäre Hypercholesterinämie identifiziert, da die Entfernung von ApoB-enthaltenden LDL-Partikeln aus der Blutzirkulation gestört ist (Brown und Goldstein, 1986). Patienten mit homo- oder heterozygoter Deletion des LDL-Rezeptor-Gens zeigen ein vermehrtes Auftreten von Erkrankungen der Herzkranzgefäße, welche frühzeitig zu Arteriosklerose oder sogar zum Tod führen können. Im Gegensatz dazu haben Patienten mit einer Hypobetalipoproteinämie einen reduzierten LDL und Cholesterin-Gehalt im Blut und damit ein vermindertes Risiko für Herzerkrankungen (Glueck et al., 1997).

Eine Senkung des LDL- und Cholesterinspiegels stellt also einen wichtigen Ansatzpunkt zur Vermeidung von frühzeitigen Herzerkrankungen dar. Therapeutische Ansätze zielen hierbei auf die Inhibition der endogenen Cholesterinsynthese in Zusammenhang mit einer drastischen Nahrungsumstellung ab. Obwohl mit diesen Ansätzen in den vergangenen Jahren einige Fortschritte in

der Handhabung von Erkrankungen dieser Art erreicht wurden, zeigen Millionen von Patienten immer noch ein erhöhtes Risiko und haben mit Folgeerkrankungen wie Herzinfarkten oder fortgeschrittener Arteriosklerose zu kämpfen. Es ist daher unbedingt erforderlich, neue Therapeutika auf diesem Gebiet zu entwickeln (Soutschek et al., 2004). Der siRNA Ansatz stellt dafür eine interessante Möglichkeit dar.

1.5 Zielsetzung

Die negative Ladung des Zucker-Phosphatrückgrats und das hohe Molekulargewicht einer siRNA verhindern eine passive Permeation der Nukleinsäure durch die Zellmembran ins Zytoplasma. Zudem ist durch den anionischen Charakter und die intrinsische Hydrophilie bereits die Annäherung an die lipophile Zellmembran erschwert. Um ein Therapeutikum auf RNAi Basis zu entwickeln, müssen diese Hürden zunächst überwunden werden. In der vorliegenden Arbeit soll daher versucht werden, durch die Anknüpfung kleiner Moleküle an den 5'-Terminus des Sense Stranges der siRNA eine Aufnahme ohne Transfektionsreagenz in das Zytoplasma zu erreichen. Es ist bereits beschrieben, dass eine Modifikation des 5'-Terminus des Sense Strangs einer siRNA toleriert wird (Lorenz et al., 2004). Hierzu sollen in Anlehnung an die Antisense-Forschung (siehe Kapitel 1.3) verschiedene siRNA-Konjugate synthetisiert werden, welche in *in vitro* Experimenten die posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression des Apolipoproteins B 100 in Leberparenchymzellen bewirken.

Ein erster Ansatz zielt auf die Erhöhung der Hydrophobizität des siRNA Moleküls und eine damit verbundene erleichterte Annäherung an die Zellmembran sowie eine eventuelle Internalisierung. Dazu wurden verschiedene Steroid-Derivate ausgewählt, die durch kurze organisch chemische Synthesesequenzen in das entsprechende Phosphoramidit überführt werden sollen, um eine Kopplung an das 5'-Ende des Sense Stranges während der RNA-Festphasensynthese zu ermöglichen (Manoharan, 2002; Lorenz et al., 2004).

Durch die Anknüpfung von Aminen, kationischen Aminosäuren und Dipeptiden soll ebenfalls die Lipophilie der siRNA erhöht werden. Des Weiteren ist eine Aufnahme der so modifizierten siRNA über Zellpenetration, bestimmte Aminosäurekanäle oder Nährstofftransporter denkbar (Antopolsky et al., 1999; Astriab-Fisher et al., 2000;

Manoharan, 2002). Diese Strategie beinhaltet die Kopplung eines *N*-Hydroxysuccinimid Aktivesters an die RNA und eine darauffolgende Amidbindungsknüpfung mit den eingesetzten Verbindungen an der Festphase.

Eine definierte Rezeptor-vermittelte Aufnahme stellt eine weitere attraktive Möglichkeit dar, um modifizierte siRNAs in das Zytoplasma einzuschleusen. So wurde bereits die Aufnahme von Antisense-Molekülen mit konjugierten Galaktose- und *N*-Acetylgalaktosamin-Strukturen über den Asialoglykoprotein-Rezeptor in Hepatozyten nachgewiesen (Biessen et al., 2000; Biessen et al., 1999; Rensen et al., 2001). Daher soll durch Glykokonjugation der siRNA mit linearen und verzweigten Galaktose-Strukturen eine Rezeptor-vermittelte Endozytose dieser Moleküle erreicht werden.

Mit den so modifizierten siRNAs soll im zweiten Teil der Arbeit die posttranskriptionelle Hemmung der endogenen *apoB* Genexpression *in vitro* erreicht werden. Daher werden die synthetisierten siRNAs in Zellkulturexperimenten hinsichtlich ihrer Aktivität bei Transfektion und Inkubation ohne Transfektionsreagenz analysiert. Des Weiteren wird der Nachweis einer definierten Aufnahme der modifizierten siRNAs in das Zytoplasma angestrebt.

2 Material und Methoden

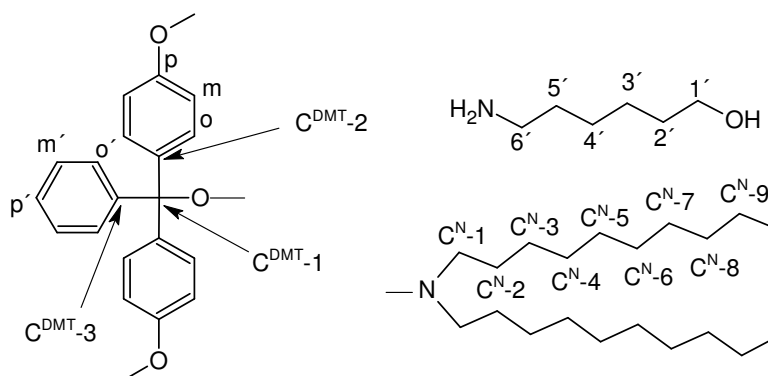
2.1 Organisch-chemische Synthese

2.1.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte

Die für die organisch-chemische Synthese verwendeten Reagenzien und Chemikalien sowie Lösungsmittel wurden von den Firmen Fluka und Sigma-Aldrich bezogen. Für die chromatographischen Trennverfahren wurden Cyclohexan (CH) und Essigsäureethylester (EE) der Firma Roth verwendet. Alle Lösungsmittel besaßen Synthesequalität ($> 99,5\%$) und die angegebenen Lösungsmittelverhältnisse verstehen sich stets als Volumenanteile (v/v).

Als Säulenmaterial für die Säulenchromatographie diente Kieselgel 60 der Firma Merck, mit einer Porengröße von 40 bis 63 μm . Zur Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumferti folien (G/UV₂₅₄) von Macherey und Nagel verwendet. Die Tauchlösungen für die DC-Chromatogramme waren von der Firma Fluka oder im Fall von Resorcinmonomethylether (250 ml Ethanol, 6,6 ml konz. H_2SO_4 , 0,25 ml 3-Methoxyphenol) selbst hergestellt. Durch Erhitzen im Heißluftstrom wurden anschließend die Verbindungen angefärbt.

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 300 MHz Spektrometer aufgenommen und mittels der Bruker XWIN-NMR 3.1 Software ausgewertet. Alle Messungen wurden in der Zentralen Analytik der Universität Bayreuth durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen konnten dabei relativ zum Lösungsmittelsignal von CDCl_3 $\delta^1\text{H} = 7,24$ ppm, $\delta^{13}\text{C} = 77,0$ ppm bestimmt werden und beziehen sich auf Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm). Zusätzlich eingeführte Gruppen wurden wie folgt benannt:



2.1.2 Chemische Synthese von Litho (3)

2.1.2.1 Synthese von 5 β -Cholansäure-(di-n-decyl)-amid (2)

Es wurden 1,5 g (3,98 mmol) Lithocholsäure **1** in einem 1:1 Gemisch aus DMF und DCM (30 ml) gelöst und anschließend ein Äquivalent (3,98 mmol) DMAP (0,48 g) und EDC x HCl (0,76 g) zugegeben und bei RT gerührt, bis alle Komponenten vollständig gelöst waren. Danach erfolgte die Zugabe von 1,2 g (3,98 mmol) Di-n-decylamin über einen Tropftrichter, wobei die Tropfgeschwindigkeit auf ca. 1 Tropfen/sec eingestellt wurde. Der Ansatz rührte für 3 h bei RT und jede Stunde wurde mittels DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1, Färbereagenz: Resorcin) der Fortgang der Reaktion überprüft. Nach vollständigem Umsatz von Lithocholsäure **1** wurde der Reaktionsansatz mit 30 ml DCM verdünnt und in einen Scheidetrichter überführt. Anschließend wurde durch Zusatz von 0,2 M HCl zuerst sauer und danach die organische Phase mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung basisch extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Produkt konnte sodann über Säulenchromatographie gereinigt werden. Die verwendete Chromatographiesäule besaß einen Durchmesser von 4,0 cm und ein Gesamtvolumen von 250 ml und war etwa mit 10 cm Kieselgel 60 gefüllt. Es wurde zu Beginn ein Lösungsmittelgemisch aus CH und EE im Verhältnis von 6:1 verwendet, um Verunreinigungen zu entfernen und anschließend auf 3:1 gewechselt, um das Produkt **2** zu isolieren. Dazu wurden die aufgefangenen Fraktionen mittels DC (CH/EE 2:1, Resorcin) analysiert, die Produktfraktionen vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt.

Ausbeute: 1,25 g (1,9 mmol, 47,7% bezogen auf Lithocholsäure **1**), hellgelber Feststoff

Rf Wert: 0,8 (CH/EE 1:1)

2.1.2.2 Synthese von 3 α -[(2-Cyanethoxy)-*N,N*-diisopropylamino-phosphanyloxy]-5 β -cholansäure-(di-n-decyl)-amid (3)

Es wurden 1,14 g (1,7 mmol) des Edukts **2** in 26 ml wasserfreiem DCM unter Argonatmosphäre gelöst. Anschließend wurden über eine Kanüle 0,85 ml (5,1 mmol) DIPEA und tropfenweise 0,415 ml (1,7 mmol) 2-

Cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidit zugegeben. Der Ansatz rührte für 2 h bei Raumtemperatur im Argongegenstrom. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (CH/EE 4:1 mit 1% TEA, Phosphormolybdänsäure). Das Triethylamin sollte dabei eine Hydrolyse der säurelabilen Phosphoramiditgruppe verhindern. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts **2** wurde die Reaktion aufgearbeitet, indem zunächst mit 30 ml DCM verdünnt und anschließend mit einer gesättigten NaCl-Lösung extrahiert wurde. Die organische Phase wurde im Anschluss rückextrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter Zusatz von Argonschutzgas entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie (Ø = 4,0 cm, V = 250 ml, Füllhöhe 8 cm, CH/EE 8:1) gereinigt, wobei das verwendete Kieselgel vorher in CH und 1% TEA aufgeschlämmt wurde. Die aufgefundenen Fraktionen wurden wieder mittels DC analysiert und die Produktfraktionen am Rotationsverdampfer unter Argonbelüftung eingeeengt.

Ausbeute: 1,05 g (1,24 mmol, 73% bezogen auf Lithocholsäure-di-n-decylamid **2**),
hellgelbes Öl

Rf-Wert: 0,6 (CH/EE 4:1 und 1% TEA)

¹H-NMR (300 MHz), CDCl₃): δ = 5,35 (NH); 3,90-3,70 (m, 3H, H-3, O-CH₂-CH₂-CN); 3,65-3,50 (m, H₂, iPr-CH, H-6); 3,30-3,20 (m, 4H, H^N-1a/b); 2,65-2,60 (t, 2H, O-CH₂-CH₂-CN); 2,30-2,10 (m, 1H, H-23a); 2,00-1,65 (m, 9H, H-23b, H-12a, H-4a, H-6a, H-22a/b, H-1a, H-2a/b); 1,60-1,00 (m, 63H, H-4b, H15a/b, H-8, H-9, H-5, H-1b, H-16a/b, H-6b, H-7a/b, H-11a/b, H12b, H-14, H-17, H-20, H^N-2a/b, H^N-3a/b, H^N-4a/b, H^N-5a/b, H^N-6a/b, H^N-7a/b, H^N-8a/b, H^N-9a/b, iPr-CH₃); 0,90-0,80 (15H, H-21, H-19, CH₃); 0,60 (3H, H-18)

¹³C-NMR (75 MHz), CDCl₃): δ = 173,01 (NH-C=O); 117,5 (O-CH₂-CH₂-CN); 74,3-74,1 (C-3); 58,3-58,1 (O-CH₂-CH₂-CN); 56,3-56,1 (2C, C17, C14); 47,9-45,8 (2C, C^N-1); 43,0-42,8 (2C, iPr-CH); 42,7 (C-13); 42,6 (C-5); 40,23 (C-9); 35,8 (C-8), 35,7 (C-20); 35,5 (C-4); 34,6 (2C, C-22, C23); 31,8 (C-10); 31,8-23,2 (14 C, C-1, C-16, C-2, C-6, C-7, C-15, C-19, C^N-2, C^N-3, C^N-4, C^N-5, C^N-6, C^N-7, C^N-8, C^N-9); 24,7-24,4 (iPr-CH₃); 22,6 (C-11); 18,5 (O-CH₂-CH₂-CN); 14,0 (C-21); 11,9 (C-18).

2.1.3 Herstellung von Chol (6)

2.1.3.1 Synthese von (*N*-6-Hydroxyhexyl)-carbamidsäurecholesterylester (5)

Hier wurde wie von Dipl. Biochemikerin Christina Lorenz (Diplomarbeit 2002, Universität Bayreuth) beschrieben, vorgegangen. 8 g (17,8 mmol) Cholesterylchloroformiat **4** wurden in 40 ml DCM gelöst und mit 2,24 g (26,7 mmol) NaHCO₃ versetzt. Der gesamte Ansatz wurde dann mit Hilfe eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt und unter starkem Rühren 2,5 g (21,3 mmol) 6-Aminohexanol, in 10 ml DCM, mit einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen/sec zugegeben. Während einer Reaktionszeit von 20 h erhöhte sich die Temperatur langsam auf 25 °C. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts **4** (DC: CH/EE 1:1, Resorcin) wurden 50 ml DCM zugegeben und mit MilliQ Wasser extrahiert, das Rohprodukt über Na₂SO₄ getrocknet und über Säulenchromatographie (Ø = 5,0 cm, V = 500 ml, Füllhöhe 12 cm, CH/EE 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 7,78 g (14,67 mmol, 82,4% bezogen auf Cholesterylchloroformiat **4**), weißer, kristalliner Feststoff

Rf-Wert: 0,76 (CH/EE 2:1)

2.1.3.2 Synthese von [6-(2-Cyanoethoxy)-*N,N*-diisopropylaminophosphanyloxy]-*N*-hexyl]-carbamidsäurecholesterylester (6)

Die Phosphitylierungsreaktion wurde abweichend von Punkt 2.1.2.2 durchgeführt. 3 g (5,66 mmol) des Edukts **5** wurden in einem 2:1 Gemisch aus ACN und DCM (80 ml) gelöst und in einen mit Argon belüfteten Kolben gefüllt. Nach Zugabe von 1,16 ml (6,79 mmol) DIPEA und 2,78 ml (8,49 mmol) 2-Cyanoethyltetrakispropylphosphan über eine Kanüle erfolgte die tropfenweise Zugabe von 12,46 ml (6,23 mmol) einer 0,5 M Lösung S-Ethylthiotetrazol (ETT). Die Reaktion wurde für 1,5 h bei RT kräftig gerührt und mittels DC-Kontrolle (CH/EE 1:1 1% TEA, Resorcin) überwacht. Die Isolierung des Produkts erfolgte, wie unter Abschnitt 2.1.2.2 beschrieben. Es wurde eine 250 ml Säule verwendet, welche einen Durchmesser von 4,0 cm besaß und etwa 10 cm mit Kieselgel gefüllt war. Dieses wurde zuvor in CH und 1% TEA aufgeschlämmt. Die Eluierung erfolgte mit einem Gemisch aus CH/EE im Verhältnis 10:1. Das isolierte Produkt wurde sofort unter Argonzusatz bei -20 °C gelagert.

Ausbeute: 2,3 g (3,15 mmol, 58,5% bezogen auf Produkt **5**), weißes Öl

Rf-Wert: 0,9 (CH/EE 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz), CDCl_3 : δ = 5.35 (d 1H, H-6); 4,58 (NH); 4,46 (m, 1H, H-3); 3.88-3.78 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-CN); 3,60-3,53 (m, 4H, H1'-a/b, iPr-CH); 3,15-3,1 (m, 2H H-6'a/b), 2,65-2,60 (t, 2H, O-CH₂-CH₂-CN); 2,4-2,1 (m, 2H, H-4a/b); 1,95-1,80 (m, 14H, H-1b, H-12b, H-7a, H-2a, H-1a), 1,60-1,30 (m, 19H, H-23^a, H-2'a/b, H-15a, H-7b, H-5'a/b, H-11a/b, H-8, H-16a/b, H-20, H-25, H-3'a/b, H-4'a/b, H-2b); 1,20-1,18 (12H, iPr-CH₃); 1,10-0,85 (m, 14H, H-1b, H-12b, H-24a/b, H-15b, H-23b, H-9, H-14, H-17, H-22^a/b, H-21); 1,00 (3H, H-19); 0,85-0,80 (6H, H-26, H-27); 0,65 (3H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz), CDCl_3 : δ = 156,1 (O-C=O-NH); 140 (C-5); 122,5 (C-6); 117,7 (O-CH₂-CH₂-CN); 74,0 (C-3); 63,6-63,4 (d, C-1'); 58,5-58,1 (d, O-CH₂-CH₂-CN); 56,5 (2C, C14, C17); 50,0 (C-9); 43,0-42,9 (2C, iPr-CH); 42,5 (C-6'); 40,8 (C-13); 39,5 (2C, C12, C24); 38,6 (C-4); 37,0 (C-1); 36,5 (C-10); 35,8 (C-20); 31,9 (2C, C-7, C-8); 31,1-31,0 (d, C2'); 30,0 (C-5'); 28,0 (3C, C2, C16, C25); 26,5-25,5 (2C, C-3', C-4'); 24,7-24,5 (4C, iPr-CH₃); 24,3 (C-15); 23,8 (C-23); 22,8-22,5 (2C, C-26, C-27); 21,0 (C-11); 20,4-20,3 (d, O-CH₂-CH₂-CN); 19,5 (C-19), 18,5 (C-21); 11,9 (C-18).

2.1.4 Synthese von Betulin (9)

2.1.4.1 Synthese von 28-[4,4'-Dimethoxytriphenylmethoxy]-lup-20(29)-en-3 β -ol (8)

1 g (2,26 mmol) Lup-20(29)-en-3 β ,28-diol **7** wurde in 3 ml Pyridin gelöst und anschließend spatelweise 1,15 g (3,39 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylchloromethan zugesetzt. Der Ansatz wurde für 36 h bei Raumtemperatur kräftig gerührt und mittels DC (CH/EE 4:1 und 1 % TEA, Resorcin) die Umsetzung kontrolliert. Der gesamte Ansatz wurde zunächst über eine mit Na₂SO₄ gefüllte Fritte (Porösität 3) filtriert, um den bei der Reaktion entstandenen Feststoff (Pyridium-hydrochlorid) abzutrennen. Die Fritte wurde sodann gründlich mit CH/EE (2:1) nachgespült und die Fraktionen vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde in CH/EE (15:1) gelöst und so für die Säulenchromatographie (\varnothing = 5,0 cm, V = 500 ml, Füllhöhe 8 cm, CH/EE 8:1) eingesetzt.

Ausbeute: 1 g (1,45 mmol, 64,2% bezogen auf Verbindung **7**), gelblich-weißer Feststoff

Rf-Wert: 0,45 (CH/EE 4:1)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz), CDCl_3 : δ = 7,45-7,2 (m, 13H, H-Ar), 4,5 (2d, 1H, H-28); 3,8 (6H, O-CH₃); 3,0-2,98 (m, 1H, H-3); 2,3 (t, 1H, H-19); 2,25-2,2 (m, 1H, H-16a); 2,18-1,95 (m, 2H, H-13, H-22a); 1,61 (1H, H-30); 1,6-0,75 (m, 32H, H-12a, H-16b, H-22b, H-1a, H-18, H-2, H-6a, H-21a, H-11a, H-6b, H-7, H-21b, H-9, H-15, H-11b, H-12b, H-1b); 0,85 (6H, H-23, H-27); 0,68 (m, 1H, H-5); 0,70-0,5 (9H, H-24, H-25, H-26)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz), CDCl_3 : δ = 158,6 (2C, p-Ar), 158,2 (C-28); 150,8 (C-20); 145,4 (C^{DMT}-3); 136,6 (C^{DMT}-2); 130,1 (4C, o-Ar); 128,2 (2C, o'-Ar); 127,7 (2C, m'-Ar); 126,5 (p'-Ar); 113,1-112,9 (4C, m-Ar); 109,3 (C-29); 85,2 (C^{DMT}-1); 78,9 (C-3); 59,4 (C-5); 56,3 (C-17); 55,2 (2C, O-CH₃); 50,4 (C-9); 48,7 (C-18); 47,7 (C-19), 40,5 (C-8); 38,8-38,6 (2C, C-4, C-1); 37,3-35,3 (3C, C-13, C-10, C-22); 33,9 (C-7); 30,1 (C-16); 29,9 (C-21); 27,9 (2C, C-15, C-23); 27,3 (C-2); 25,1 (C-12); 20,6 (C-11,); 19,0 (C-30); 18,2 (C-6); 16,0-15,3 (3C, C-24, C-25, C-26); 14,7 (C-27)

2.1.4.2 Synthese von 28-[4,4'-Dimethoxytriphenylmethoxy]-3 β -[(2-cyanoethoxy)-*N,N*-diisopropylaminophosphanyloxy]-lup-20(29)-en (**9**)

Die Phosphitylierungsreaktion wurde analog zur Synthese von Verbindung **6** durchgeführt. Dazu wurde 1 g des Edukts **8** in 20 ml ACN gelöst und anschließend 0,31 ml (1,74 mmol) DIPEA und 0,72 ml (2,18 mmol) 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphan zugegeben. Abschließend wurden 3,19 ml (1,6 mmol) S-Ethylthiotetrazol zugesetzt und der Ansatz für 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Verdünnung des Ansatzes mit 30 ml DCM und anschließender Extraktion mit einer gesättigten NaCl-Lösung (siehe Abschnitt 2.1.2.2). Für die Säulenchromatographie wurde eine 500 ml Säule (\varnothing = 5,0 cm) verwendet, welche 6 cm hoch mit Kieselgel 60 gefüllt war. Dieses wurde zuvor in CH mit 1% TEA aufgeschlämmt. Die Isolierung des Produkts erfolgte mit einem Gemisch aus CH und EE im Verhältnis 10:1.

Ausbeute: 0,43 g (0,46 mmol, 33,5 % bezogen auf Verbindung **8**), weiße Emulsion

Rf-Wert: 0,75 (CH/EE 4:1)

2.1.5 Synthese von 3BChol (11)

Es wurden 2 g (5,15 mmol) 3- β -Cholestanol **10** mit 2,5 ml (7,70 mmol) 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphan, 1,07 ml (6,18 mmol) DIPEA und 11,33 ml (5,67 mmol) 0,5 M ETT in 50 ml ACN umgesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu Verbindung **3** (Kapitel 2.1.2.2). Die anschließende Säulenchromatographie (Säule V= 500 ml, \varnothing = 5,0 cm, Füllhöhe 7 cm, CH/EE 8:1) lieferte Produkt **11**.

Ausbeute: 0,575 g (1,03 mmol, 20% Ausbeute bezogen auf Edukt **10**), weißes Öl

Rf-Wert: 0,8 (CH/EE 4:1)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz), CDCl_3 : δ = 4,0-3,88 (m, 3H, H-3, O-CH₂-CH₂-CN); 3,8-3,5 (m, H₂, iPr-CH, H-6); 2,9-2,7 (m, 1H, H-23a); 2,5-2,4 (t, 2H, O-CH₂-CH₂-CN); 2,0-1,0 (m, 9H, H-23b, H-12a, H-4a, H-6a, H-22a/b, H-1a, H-2a/b, 63H, H-4b, H15a/b, H-8, H-9, H-5, H-1b, H-16a/b, H-6b, H-7a/b, H-11a/b, H12b, H-14, H-17, H-20, iPr-CH₃); 0,87-0,77 (21H, H-21, H-19, CH₃, H-26, H-27); 0,6 (3H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz), CDCl_3 : δ = 117,6 (O-CH₂-CH₂-CN); 73,8 (C-3); 58,3-58,1 (O-CH₂-CH₂-CN); 58,0-54,7 (2C, C17, C14); 45,0-44,9 (2C, iPr-CH); 42,8 (C-13); 42,6 (C-5); 40,0 (C-9); 39,5 (C-8), 37,1 (C-20); 37,0 (C-4); 36,1 (2C, C-22, C23); 35,5 (C-10); 32,0-28,2 (8C, C-1, C-16, C-2, C-6, C-7, C-15, C-19, C23); 24,7-24,4 (iPr-CH₃); 24,4-24,3 (2C, C26, C27); 23,8 (C-11); 21,2 (O-CH₂-CH₂-CN); 20,2 (C-21); 12,3 (C-18)

2.1.6 Möglichkeit A zur Synthese von GAL (18)

2.1.6.1 Synthese von 1-O-[(2Z)-4-Benzoyloxybut-2-enyl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galaktopyranosid (**13**)

Zu Beginn wurde ein Zweihalskolben evakuiert und mit Argon belüftet (Überglucker, 3-4 Bläschen/min). Über den anderen Einlass des Kolbens wurden 5 g (12,81 mmol) β -D-Galaktosepentaacetat **12** in den Kolben gegeben und mit 40 ml DCM gelöst. Molekularsieb 4Å (Prime Synthesis) wurde zugesetzt und der Kolben anschließend mit einem Tropftrichter luftdicht verschlossen und darüber 3,23 ml (19,21 mmol) 4-Benzoyloxy-2-buten-1-ol zugetropft. Nach Kühlung auf 0°C und 30 minütigem Rühren bei dieser Temperatur wurde über den Tropftrichter innerhalb von 10 min 3,24 ml

(25,62 mmol) $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ zugegeben und die Reaktion für 18 h gerührt. Dabei erhöhte sich die Temperatur langsam auf Raumtemperatur. Da nach dieser Zeit die Umsetzung noch nicht vollständig war (DC: CH/EE 2:1, Resorcin), wurden weitere 0,5 Äquivalente (1,07 ml, 6,4 mmol) *cis*-Benzyloxy-2-buten-1-ol zugegeben und jede Stunde der Fortgang der Reaktion mittels DC überprüft. Nach 3 h war das Ausgangsprodukt **10** verbraucht und die Reaktion wurde zunächst mit 30 ml DCM verdünnt und dann auf 0°C abgekühlt. Nach 15 min bei 0°C wurden 2 ml TEA zugesetzt, um das $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ zu neutralisieren. Es wurde weitere 20 min bei 0°C gerührt und der gesamte Ansatz, zur Entfernung des Molekularsiebs, über eine mit Na_2SO_4 gefüllte Fritte (Porösität 3) filtriert. Die erhaltene schwarz/grüne Lösung wurde sodann sauer (0,2 M HCl) und basisch (gesättigte NaHCO_3 -Lösung) extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das gelblich-orange Öl zur Säulenchromatographie eingesetzt. Hierzu wurde eine Chromatographiesäule mit einem Volumen von 1000 ml und einem Durchmesser von 6,0 cm eingesetzt, die zu 12 cm hoch mit Kieselgel 60 gefüllt wurde. Die Elution des Produkts **13** erfolgte mit einem Gemisch aus CH und EE im Verhältnis 4:1.

Ausbeute: 4,44 g (8,73 mmol, 68,2% bezogen auf β -D-Galaktosepentaacetat **12**), gelbes Öl (1:1 Gemisch aus Produkt **11** und 4-*cis*-Benzyloxy-2-buten-1-ol)

Rf-Wert: 0,3 (CH/EE 2:1)

2.1.6.2 Synthese von 1-O-(2*Z*)-4-Benzyloxybut-2-enyl- β -D-galaktopyranosid (**14**)

4,44 g (8,73 mmol) des Edukts **13** wurden in 10 ml Methanol gelöst und sogleich 0,5 ml Natriummethylat (25 % ige Lsg in MeOH) zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei RT gerührt und die Bildung des deacetylierten Pyranosids **14** mittels DC (EE/MeOH 5:1, Resorcin) kontrolliert. Für die Aufarbeitung wurde Anionenaustauschmaterial Amberlit IR-120 mit Methanol gewaschen, bis der Durchfluss farblos war. Der Reaktionsansatz wurde 1:1 mit Methanol verdünnt und das vorbereitete Amberlit IR-120 zugegeben. Es wurde solange gerührt, bis der pH Wert von stark basisch auf neutral umgeschlagen war. Das Amberlit wurde durch Filtration entfernt und die Lösung über Na_2SO_4 getrocknet. Die Chromatographie

wurde mit einer 1000 ml Säule ($\varnothing = 6,0$ cm) durchgeführt und einer Füllhöhe von 8 cm Kieselgel 60. Das gewünschte Produkt **14** wurde mit EE/MeOH im Verhältnis 13:1 eluiert.

Ausbeute: 1,15 g (3,37 mmol, 77,2% bezogen auf Edukt **13**), hellgelbes Öl

Rf-Wert: 0,4 (EE/MeOH 5:1)

2.1.6.3 Synthese von 1-*O*-[(2*Z*)-4-Benzyl oxybut-2-enyl] -6-*O*-(4-methoxy-triphenylmethyl)- β -*D*-galaktopyranosid (**15**)

Für die Tritylierung von Verbindung **14** wurden 1,15 g (3,37 mmol) in 5 ml Pyridin gelöst und spatelweise 1,56 g (5,05 mmol) 4-Monomethoxytritylchlorid zugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (EE/MeOH 3:1, Resorcin) konnte die Reaktion überwacht werden. Da nach 16 h die Reaktion noch nicht vollständig beendet war, wurden weitere 0,5 Äquivalente (0,52 g) 4-Monomethoxytrityl-chlormethan zugesetzt. 2 h nach Zugabe war kein Edukt mehr vorhanden und der gesamte Ansatz wurde sogleich ohne Aufreinigung für die nächste Synthesestufe eingesetzt.

2.1.6.4 Synthese von 1-*O*-[(2*Z*)-4-Benzyl oxybut-2-enyl] -6-*O*-(4-methoxy-triphenylmethyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-galaktopyranosid (**16**)

Die Acetylierung wurde mit dem Gesamtansatz der Tritylierung aus Abschnitt 2.1.6.3 (theoretisch 3,37 mmol) durchgeführt. Dazu wurden 3,83 ml (40,44 mmol) Acetanhydrid in den Reaktionsansatz pipettiert und zusätzlich 4,6 ml Pyridin zugegeben. Nach 48 h wurde der Ansatz mit 40 ml DCM verdünnt und sauer/basisch (0,2 M HCl, gesättigte NaHCO₃-Lösung) extrahiert. Das erhaltene Produkt **16** wurde mit einem Gemisch aus 5:1 CH/EE eluiert (Säule V = 500 ml, $\varnothing = 5,0$ cm, Füllhöhe 10 cm).

Ausbeute: 1,3 g (1,76 mmol, 52% bezogen auf Verbindung **15**), weißer Feststoff

Rf-Wert: 0,8 (CH/EE 4:1)

2.1.6.5 Synthese von 1-*O*-(4-Hydroxybutyl)-6-*O*-(4-methoxytriphenylmethyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β (α)-*D*-galaktopyranosid (**17**)

Für die Hydrierung von Verbindung **16** wurden zunächst verschiedene Synthesebedingungen, Lösungs- und Hydrierungsmittel mit einer kleinen Menge an Edukt ausprobiert. Die Hauptmenge an **16** wurde mit den effektivsten Bedingungen zu Verbindung **17** umgesetzt. Es wurden 1,1 g (1,48 mmol) des Edukts **16** in einen Zweihalskolben eingewogen und in 10 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 2 Spatelspitzen Palladiumhydroxid auf Aktivkohle zugesetzt und der Kolben mit einem Septum verschlossen, evakuiert und von nun an in Wasserstoffatmosphäre gearbeitet. Der Ansatz wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und mittels DC (CH/EE 1:1, Resorcin) beobachtet. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit 20 ml Methanol verdünnt und über eine Fritte mit der Porösität 4 und Na₂SO₄ filtriert, um das Palladiumhydroxid zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt zur Säulenchromatographie (Säule V = 500 ml, Ø = 5,0 cm, Füllhöhe 8 cm, CH/EE 1:1) eingesetzt.

Ausbeute: 0,68 g (1,05 mmol, 70,9% bezogen auf Verbindung **16**), weißer Feststoff

Rf-Wert: 0,35 (CH/EE 1:1)

¹H-NMR (300 MHz), CDCl₃): 5,35-5,30 (d, $J_{1/2}$ = 3,2 Hz, 1H, H-1 α); 4,40-4,3 (d, $J_{1/2}$ = 7,91 Hz, 1H, H-1 β).

¹³C-NMR(75 MHz), CDCl₃): δ = 170,9-169,9 (3C, O=C-CH₃); 158,5 (p-Ar); 144,7 (2C, C^{MMT}-3); 135,9 (C^{MMT}-2); 130,1 (2C, o-Ar); 128,3 (4C, o'-Ar); 127,7 (4C, m'-Ar); 126,6 (4C, p'-Ar); 113,0 (2C, m-Ar); 101,1 (C-1 β); 95,8 (C-1 α); 86,5 (C^{MMT}-1); 72,0 (C-2); 71,1 (C-3); 70,9 (C-4); 69,7 (C-5); 67,8 (C-1'); 62,7 (C-4'); 60,6 (C-6); 55,1 (O-C-CH₃); 26,3 (C-2'); 26,0 (C-3'); 20,9 (3C, O=C-CH₃).

2.1.6.6 Synthese von 1-*O*-{4-[(2-Cyanethoxy)-*N,N*-diisopropylamino phosphanyloxy]-butyl}-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β (α)-*D*-galaktopyranosid (**18**)

Die Phosphylierungsreaktion wurde analog Abschnitt 2.1.3.2 durchgeführt. Das Edukt **17** (0,68 g, 1,05 mmol) wurde in 25 ml ACN gelöst und mit 0,25 ml (1,44 mmol) DIPEA, 0,59 ml (1,8 mmol) 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphan und 2,64 ml (1,32

mmol) ETT versetzt. Nach 1,5 h bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 35 ml DCM verdünnt und sofort mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt (Säule V = 250 ml, Ø = 4,0 cm, Füllhöhe 6,0 cm, CH/EE 3:1).

Ausbeute: 0,74 g (0,87 mmol, 82,8% bezogen auf Verbindung **17**), weißer, kristalliner Feststoff

Rf-Wert: 0,8 (CH/EE 1:1)

2.1.7 Möglichkeit B zur Synthese von GAL (**18**)

2.1.7.1 Synthese von 1-*O*-(4-Benzoyloxybutyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galaktopyranosid (**13a**)

Wie in Abschnitt 2.1.6.1. beschrieben, wurden 5 g (12,81 mmol) β-*D*-Galaktosepentaacetat **12** mit 3,23 ml (19,21 mmol) 4-Benzoyloxy-1-butanol und 3,24 ml (25,62 mmol) Bortrifluorid-diethyletherat in 40 ml DCM versetzt und für 18 h gerührt (0°C → RT). Da die Reaktion nach dieser Zeit noch nicht vollständig beendet war, wurden weitere 1,07 ml (6,4 mmol) 4-Benzoyloxy-1-butanol und 1,07 ml (8,5 mmol) BF₃Et₂O bei 0°C zugegeben. 20 h nach der erneuten Zugabe war die Reaktion deutlich zum Produkt **13a** verschoben und der Ansatz wurde wie in Abschnitt 2.1.6.1 aufgearbeitet und ohne Säulenchromatographie in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

2.1.7.2 Synthese von 1-*O*-(4-Benzoyloxybutyl)-β-*D*-galaktopyranosid (**14a**)

Für die Deacetylierung von **13a**, wurde das gesamte Produkt aus der vorherigen Stufe (theoretisch 12,81 mmol) in 10 ml Methanol gelöst. Es wurden 0,7 ml Natriummethylat zugesetzt und die Reaktion für 2 h bei RT gerührt (siehe Abschnitt 2.1.6.2). Die Aufarbeitung und die Säulenchromatographie erfolgten analog zu Punkt 2.1.6.2, allerdings wurde das Kieselgel direkt in EE aufgeschlämmt.

Ausbeute: 1,51 g (4,43 mmol, 88,6% bezogen auf **13a**), gelbes Öl

Rf-Wert: 0,41 (EE/MeOH 5:1)

2.1.7.3 Synthese von 1-*O*-(4-Benzoyloxybutyl) -6-*O*-(4-methoxy-triphenylmethyl)- β -*D*-galaktopyranosid (**15a**)

Auch diese Synthese wurde wie bereits beschrieben (Abschnitt 2.1.6.3), durchgeführt. 1,51 g (4,43 mmol) von **14a** wurden in 5 ml Pyridin gelöst und spatelweise 2,65 g (6,65 mmol) 4-Monomethoxytritylchlorid zugegeben. Nach 18 h und weiterer Zugabe von 0,5 Äquivalenten MMT-Cl (0,5 g) war die Reaktion beendet und der gesamte Ansatz wurde für die nächste Stufe eingesetzt.

2.1.7.4 Synthese von 1-*O*-(4-Benzoyloxybutyl) -6-*O*-(4-methoxy-triphenylmethyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-galaktopyranosid (**16a**)

Theoretisch wurden aus der Tritylierung von **15a** 4,43 mmol gewonnen. Diese wurden analog zur Synthese von **14** (Abschnitt 2.1.6.4) mit 5,0 ml (53,16 mmol) Acetanhydrid versetzt und zusätzlich nochmals 4 ml Pyridin zugegeben. Nach 48 h wurde die Reaktion abgebrochen, da sich ein nicht weiter charakterisiertes Nebenprodukt gebildet hatte (DC: CH/EE 4:1, Resorcin). Die Aufarbeitung wurde wie in Abschnitt 2.1.6.4 durchgeführt.

Ausbeute: 0,37 g (0,5 mmol, 11,3% bezogen auf Verbindung **15a**), weiß, gelber Feststoff

Rf-Wert: 0,65 (CH/EE 4:1)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz), CDCl_3 : 5,2-5,1 (d, $J_{1/2} = 7,6$ Hz, 1H, H-1 β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz), CDCl_3 : $\delta = 170,1$ - $169,3$ (3C, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$); 158,6 (p-Ar); 144,8 (2C, $\text{C}^{\text{MMT-3}}$); 134,9 ($\text{C}^{\text{MMT-2}}$); 129,5 (2C, o-Ar); 128,3 (4C, o'-Ar); 127,8 (4C, m'-Ar); 127,6-127 (6C, Bz); 126,9 (4C, p'-Ar); 113,0 (2C, m-Ar); 101,1 (C-1 β); 86,5 ($\text{C}^{\text{MMT-1}}$); 73,5 ($\text{O}-\text{CH}_2\text{-Bz}$); 72,7 (C-2); 72,0 (C-3); 71,1 (C-4); 69,8 (C-5); 69,1 (C-1'); 67,3 (C-4'); 60,6 (C-6); 55,1 ($\text{O}-\text{CH}_3$); 26,1 (C-2'); 26,0 (C-3'); 20,7 (3C, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$).

2.1.7.5 Synthese 1-*O*-(4-Hydroxybutyl) -6-*O*-(4-methoxytriphenylmethyl)- 2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-galaktopyranosid (**17**)

Die Hydrierung wurde wie unter Punkt 2.1.6.5. beschrieben durchgeführt. 0,37 g (0,499 mmol) der Verbindung **16a**, wurden mit Palladiumhydroxid auf Aktivkohle

versetzt und in Methanol gerührt bis das Edukt verbraucht war. Die Isolierung des Produkts erfolgte analog zu Verbindung **17** (Abschnitt 2.1.6.5).

Ausbeute: 0,15 g (0,232 mmol, 46,5% bezogen auf Verbindung **16a**), weißer, kristalliner Feststoff

Rf-Wert: 0,33 (CH/EE 1:1)

2.1.7.6 Synthese von 1-*O*-{4-[(2-Cyanethoxy)-*N,N*-diisopropylamino-phosphanyloxy]-butyl}-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-galaktopyranosid (**18**)

Die Einführung der Phosphoramidit-Gruppe erfolgte analog zu Punkt 2.1.6.6. Es wurden 0,15 g (0,232 mmol) der Verbindung **17** mit 0,048 ml (0,278 mmol) DIPEA, 0,114 ml (0,348 mmol) 2-Cyanoethyltetrakisopropylphosphan und 0,51 ml (0,255 mmol) 0,5 M ETT versetzt und in 5 ml ACN für 1,5 h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung und Säulenchromatographie wurden, wie beschrieben (2.1.6.6) durchgeführt.

Ausbeute: 0,13 g (0,153 mmol, 66% bezogen auf Verbindung **17**), weiß, kristallin

Rf-Wert: 0,83 (CH/EE 1:1)

2.1.8 Möglichkeit C zur Synthese von GAL 18

2.1.8.1 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -*D*-Galaktopyranose (**19**)

Es wurden 20 g (51,24 mmol) β -*D*-Galaktosepentaacetat **12** in 150 ml THF gelöst und langsam über einen Tropftrichter (1 Tropfen/sec.) 6,7 ml (61,49 mmol) Benzylamin zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT für 18 h gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer bis auf etwa 10 ml eingeeengt. Anschließend wurde der Ansatz mit 40 ml DCM verdünnt und sauer/basisch (0,2 M HCl, ges. NaHCO₃-Lösung) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und das erhaltene Rohprodukt direkt in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

2.1.8.2 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*D*-galaktopyranosyl-trichloracetimidat (**20**)

Das Edukt **19** wurde in 50 ml (240 mmol) Trichloracetonitril gelöst und auf -20 °C abgekühlt (Eisbad in Ethanol und NaCl). Anschließend wurden über einen Zeitraum von 15 min 3,56 ml (23,96 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en in 10 ml DCM, zugetropft. Nach 1,5 h war das Edukt **19** umgesetzt (DC: CH/EE 1:1, Resorcin) und der gesamte Ansatz wurde bis auf 15 ml am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das so erhaltene braune Öl wurde zur Säulenchromatographie (Säule V = 1000 ml, Ø = 6,0 cm, Füllhöhe 10 cm, CH/EE 4:1) eingesetzt.

Ausbeute: 20,24 g (41,08 mmol, 71,5% bezogen auf Verbindung **19**), gelber Feststoff

Rf-Wert: 0,65 (CH/EE 1:1)

2.1.8.3 Synthese von 1-*O*-(4-*tert*-Butyldimethylsilyloxybutyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galaktopyranosid (**21**)

Für die Umsetzung von Verbindung **20** mit TBS-Butanol wurden zunächst verschiedene Synthesebedingungen evaluiert. Mit dem Hauptprodukt **20** aus Abschnitt 2.1.8.2 wurde die folgende Reaktion durchgeführt. Es wurden 2,47 g (9,59 mmol) Silber-trifluormethansulfonat in 0,5 ml Toluol gelöst und auf -78 °C mit einem Trockeneisbad in Ethanol gekühlt. 19 g (38,38 mmol) der Verbindung **20** wurden mit 13,34 ml (57,57 mmol) 4-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-oxy-1-butanol in 150 ml DCM über einen Tropftrichter zugegeben (20 Tropfen/min). Der Ansatz wurde für 20 h kräftig gerührt, wobei sich die Temperatur langsam auf 20 °C erhöhte. Anschließend wurden 0,3 Äquivalente (1,6 ml) TEA zugegeben und der Ansatz mit 50 ml DCM verdünnt. Sodann wurde sauer/basisch (0,2 M HCl/ges. NaHCO₃ Lösung) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **21** konnte mit einem Gemisch aus CH/EE im Verhältnis 6:1 isoliert werden (Säule V = 1000 ml, Ø = 6,0 cm, Füllhöhe 12 cm).

Ausbeute: 15,82 g (29,29 mmol, 77,95% bezogen auf Verbindung **20**), gelblich, weißer Feststoff

Rf-Wert: 0,9 (CH/EE 1:1)

2.1.8.4 Synthese von 1-*O*-(4-*tert*-Butyldimethylsilyloxybutyl)- β -*D*-galaktopyranosid (**22**)

Die Deacetylierung mit Natriummethylat wurde bereits in Abschnitt 2.1.6.2 beschrieben. Es wurden 15,82 g (29,29 mmol) der Verbindung **21** in 30 ml DCM und 2 ml Natrium-Methylat eingesetzt. Nach 3 h war das Edukt **21** umgesetzt (DC: EE/MeOH 5:1) und der Ansatz wurde wie bereits unter 2.1.6.2 beschrieben aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt **22** wurde ohne weitere Reinigung für die nächste Synthesestufe eingesetzt.

2.1.8.5 Synthese von 1-*O*-(4-*tert*-Butyldimethylsilyloxybutyl)-6-*O*-(4-methoxytriphenylmethyl)- β -*D*-galaktopyranosid (**23**)

Aus der vorherigen Reaktion wurden theoretisch 29,29 mmol der Verbindung **22** erhalten. Diese wurde in 30 ml Pyridin mit 17,5 g (43,94 mmol) 4-Methoxytrytylchloromethan umgesetzt (siehe Abschnitt 2.1.6.3). Nach 27 h und der weiteren Zugabe von 0,5 Äquivalenten (6 g) MMT-Cl war das Edukt vollständig umgesetzt und der gesamte Ansatz wurde ohne Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

2.1.8.6 Synthese von 1-*O*-(4-*tert*-Butyldimethylsilyloxybutyl)-6-*O*-(4-methoxytriphenylmethyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-galaktopyranosid (**24**)

Die Acetylierung wurde bereits in Abschnitt 2.1.6.4 näher erläutert. Es wurden theoretisch 29,29 mmol der Verbindung **23** mit 33 ml (351,5 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt und weitere 15 ml Pyridin zugegeben. Nach 16 h war das Edukt vollständig umgesetzt (DC: CH/EE 4:1, Resorcin) und die Aufarbeitung wurde analog zur Synthese von Verbindung **16** durchgeführt (Abschnitt 2.1.6.4). Allerdings wurde zuvor das Pyridin am Rotationsverdampfer fast vollständig entfernt. Die Isolierung des Produkts erfolgte mit CH/EE 10:1 (Säule V = 1000 ml, Ø = 6,0 cm, Füllhöhe 15 cm).

Ausbeute: F1 16,89 g Mischfraktion mit MMT-Cl, (etwa zu 30% Produkt **23**, 6,5 mmol) gelb-braunes Öl

F2 11,34 g (14,83 mmol, 50,6% bezogen auf Verbindung **23**), gelb-braunes Öl, Mischfraktion mit MMT-Cl

Rf-Wert: 0,7 (CH/EE 4:1)

Die isolierte Fraktion F2 wurde auf Grund der geringen Reinheit erneut chromatographiert (V = 1000 ml, Ø = 6,0 cm, Füllhöhe 12 cm, CH/EE 10:1).

Ausbeute: 2,16 g (2,82 mmol, 9,6% bezogen auf Verbindung **23**), braunes Öl

Rf-Wert: 0,72 (CH/EE 4:1)

2.1.8.7 Synthese von 1-*O*-(4-Hydroxybutyl) -6-*O*-(4-methoxytriphenylmethyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-*D*-galaktopyranosid (**17**)

Verbindung **16** (Fraktion 1) aus Abschnitt 2.1.8.6 wurde in 15 ml THF gelöst und über einen Tropftrichter 4 ml (22,25 mmol) Tetrabutylammoniumfluorid (1 M in THF) zugegeben (1 Tropfen/sec). Nach 24 h war die Abspaltung vollständig (DC: CH/EE 2:1) und der gesamte Ansatz wurde per Chromatographie gereinigt (Säule V = 1000 ml, Ø = 6,0 cm, Füllhöhe 15 cm, CH/EE 3:1).

Ausbeute: 2,2 g (3,38 mmol, 52% bezogen auf 6,5 mmol von **24** in F1), weißer Feststoff

Rf-Wert: 0,2 (CH/EE 4:1)

Fraktion 2 (2,16 g, 2,82 mmol) wurde in 10 ml THF aufgenommen und mit 0,8 ml (4,3 mmol) Tetrabutylammoniumfluorid (1M in THF) versetzt. Nach 20 h wurde der Ansatz (siehe oben) aufgearbeitet.

Ausbeute: 1,32 g (2,03 mmol, 70,7% bezogen auf F2 von Verbindung **24**), weiß, kristallin

Rf-Wert: 0,3 (CH/EE 2:1)

¹H-NMR (300 MHz), CDCl₃: 4,9-5,0 (d, J_{1/2} = 6,77 Hz, 1H, H-1β).

¹³C-NMR(75 MHz), CDCl₃: δ = 171,1-169,9 (3C, O=C-CH₃); 158,6 (p-Ar); 144,8 (2C, C^{MMT}-3); 136,0 (C^{MMT}-2); 130,9 (2C, o-Ar); 128,3 (4C, o'-Ar); 127,7 (4C, m'-Ar); 126,9 (4C, p'-Ar); 113,1 (2C, m-Ar); 103,1 (C-1β); 86,4 (C^{MMT}-1); 72,8 (C-2); 72,5 (C-3); 72,0 (C-4); 70,3 (C-5); 69,3 (C-1'); 68,0 (C-4'); 62,3 (C-6); 55,1 (O-C-CH₃); 26,8 (C-2'); 26,4 (C-3'); 22,6 (3C, O=C-CH₃).

2.1.8.8 Synthese von Synthese von 1-*O*-{4-[(2-Cyanoethoxy)-*N,N*-diisopropyl-aminophosphanyloxy]-butyl}-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-galaktopyranosid (**18**)

Für die Phosphitylierung wurden die Fraktionen 1 und 2 der Verbindung **17** aus Abschnitt 2.1.8.7 vereinigt (3,5 g, 5,38 mmol) und wie bereits für Produkt **6** (Abschnitt 2.1.3.2) beschrieben, mit 1,12 ml (6,454 mmol) DIPEA, 2,65 ml (8,069 mmol) 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphan und 11,8 ml (5,917 mmol) 0,5 M ETT in 20 ml ACN umgesetzt. Sowohl die Aufarbeitung als auch die Säulenchromatographie wurden analog zu Punkt 2.1.6.6 durchgeführt.

Ausbeute: 2,6 g (3,1 mmol, 74,3% bezogen auf Verbindung **17**), weiß, kristallin

Rf-Wert: 0,65 (CH/EE 2:1)

2.1.9 Synthese eines GalNAc-Phosphoramidits

2.1.9.1 Umsetzung von *N*-Acetylgalaktosamin mit 4-*cis*-Benzyloxy-buten-1-ol

Die Synthese wurde analog zu Verbindung **13** durchgeführt (Abschnitt 2.1.6.1). Allerdings konnte keine Umsetzung von *N*-Acetylgalaktosamin **25** mit 4-*cis*-Benzyloxy-buten-1-ol beobachtet werden.

2.2 RNA-Synthese

2.2.1 RNA-Festphasensynthese

Die Synthese der RNA-Einzelstränge erfolgte an einem ExpediteTM Synthesizer von PerSeptive Biosystems nach einem Standard-Protokoll (Damha und Ogilvie, 1993). Die dafür benötigten 1 μ mol Synthesesäulen wurden von der Firma Proligo bezogen und enthielten bereits das erste Synthon (rA, ru, rG, rC). Dieses ist über einen langkettigen Alkyl-Succinoyl-Linker an das Trägermaterial (Controlled Pore Glass) gebunden. Für den 10 μ mol-Maßstab wurde auf bereits vorsynthetisierte RNA aus einer Großmaßstab-Synthese zurückgegriffen, das entsprechende CPG-Material in Kartuschen gefüllt und lediglich die letzte Kopplung der hergestellten Amidite am Synthesizer durchgeführt. Eine Auflistung der verwendeten Standard-Amidite der Firma Proligo findet sich in Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: Verwendete Standard-Phosphoramidite für die Festphasensynthese; TBDMS=*tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe, DMT=Dimethoxytrityl-Gruppe, TAC=*ter*-Butylphenoxyacetyl-Gruppe.

Bezeichnung	Abkürzung	2'-Ribose Funktionalität	5'-Ribose Funktionalität	Basenschutz- gruppen
Adenosin	A	TBDMS	DMT	TAC
Guanosin	G	TBDMS	DMT	TAC
Cytidin	C	TBDMS	DMT	TAC
Uridin	U	TBDMS	DMT	-
Uridin 2'-OMe	u	OMe	DMT	-
Cytidin 2'-OMe	c	OMe	DMT	TAC

Alle weiteren für die Festphasensynthese verwendeten Reagenzien wurden ebenfalls von der Firma Proligo sowie von der Firma Baker bezogen und sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Reagenzien für die RNA-Festphasensynthese.

Reagenzien	Zusammensetzung
Aktivator	500 mM Ethylthiotetrazol (ETT) in Acetonitril (ACN)
Deblock	3% Trichloressigsäure (TCA) in Dichlormethan (DCM)
Oxidizer	2,5% Iod in Tetrahydrofuran (THF), Wasser und Pyridin (Pyr)
Thiolierung	50 mM 3-Ethoxy-1,2,4-dithiazolin-5-on (EDITH) in ACN
CAP A	10% Acetanhydrid in 10% Pyridin, THF
CAP B	15% Methylimidazol in THF
Waschlösung	Acetonitril (für DNA und RNA-Synthese; 30 ppm Wasser)

Des Weiteren wurden Sonderamidite für die RNA-Synthese eingesetzt. Diese sind bei den Firmen ChemGenes Corporation und GlenResearch kommerziell erhältlich und in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.3: Sonderamidite für die RNA-Festphasensynthese; CED=(2-Cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit; DMT=Dimethoxytrityl-Gruppe; MMT=Monomethoxytrityl-Gruppe.

Bezeichnung	Abkürzung	Modifikation
5'-Carboxy Modifier C10	NHS	CED-Phosphoramidit
Indodicarbocyanine3-1-o-CED-Phosphoramidit	Cy3	CED-Phosphoramidit und MMT
Symmetrical Branching CED-Phosphoramidit	SB	CED-Phosphoramidit und DMT
DMT-Tetraethyloxy-Glycol-Phosphoramidit	TEG	CED-Phosphoramidit und DMT

Alle zur Synthese verwendeten Amidite wurden in Amidite Diluent (Proligo) oder DCM (Fluka) gelöst, so dass eine 0,07 M Lösung entstand. Anschließend wurde 4Å Molekularsieb (Roth) zugegeben und die Lösung so direkt zur Synthese eingesetzt.

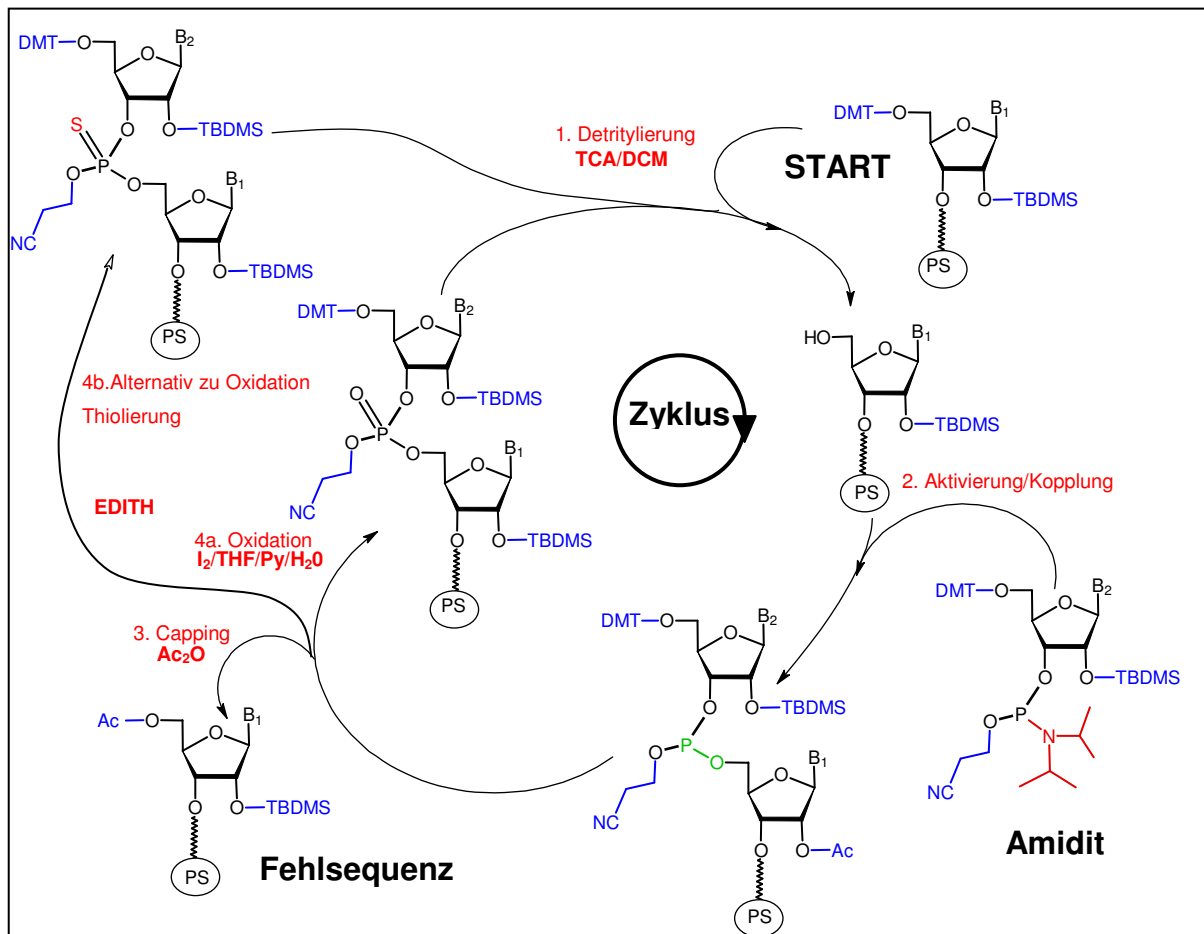


Abbildung 2.1: RNA-Synthesezyklus. Dargestellt sind die vier Syntheseschritte unter Angabe der verwendeten Reagenzien.

Im Gegensatz zur natürlichen RNA-Synthese, verläuft die Synthese am Synthesizer in 3' → 5'-Richtung, so dass eine Kopplung der hergestellten Amidite am 5'-Ende eines jeden RNA-Stranges möglich war. Ein Synthesezyklus gliederte sich in vier Schritte auf Detritylierung, Aktivierung/Kopplung, Capping und Oxidation (siehe Abb. 2.1). Die genauen Volumina und Reaktionszeiten können Tabelle 2.4 und 2.5 entnommen werden. Phosphorothioate wurden durch eine Änderung des Oxidationsschritts im Synthesezyklus eingeführt. Dieser (Abb. 3.1, 4a) wurde in einen Thiolierungsschritt (Abb. 2.1 4b) umgewandelt indem das Oxidationsreagenz (2,5% Iod in Tetrahydrofuran, Wasser und Pyridin) durch ein Thionylierungsreagenz (50 mM 3-Ethoxy-1,2,4-dithiazolin-5-on [EDITH] in ACN) ersetzt wurde (Xu et al., 1996b).

Tabelle 2.4: Ablauf des Syntheszyklus für kommerzielle Amidite. Angegeben sind die verwendeten Reagenzien, deren Menge und die jeweiligen Kopplungszeiten bzw. Pulse.

Schritt	Reagenz und Menge	Kopplungszeit	Synthesemaßstab
Detritylierung	Deblock 1,6 ml	100 sec	1 µmol
	Deblock 2,6 ml	160 Pulse	10 µmol
Kopplung	Amidit/ETT Lösung 1:1 0,192 ml	180 sec	1 µmol
	Amidit/ETT Lösung 1:1 0,432 ml	240 sec	10 µmol
1. Capping	CapA/CapB Lösung 1:1 0,304 ml	19 Pulse	1 µmol
	CapA/CapB Lösung 1:1 0,604 ml	40 Pulse	10 µmol
Oxidation	Oxidizer 0,640 ml	30 sec	1 µmol
	Oxidizer 1,2 ml	45 sec	10 µmol
2. Capping	CapA/CapB Lösung 1:1 0,112 ml	7 Pulse	1 µmol
	CapA/CapB Lösung 1:1 0,960 ml	60 Pulse	10 µmol

Tabelle 2.5: Ablauf des Syntheszyklus für kommerzielle Linker-Amidite und in dieser Arbeit hergestellte Amidite unter Angabe der verwendeten Reagenzien, deren Menge und der jeweiligen Kopplungszeiten.

Schritt	Reagenz und Menge	Kopplungszeit	Synthesemaßstab
Detritylierung	Deblock 1,6 ml	100 sec	1 µmol
	Deblock 2,6 ml	160 Pulse	10 µmol
Kopplung	Amidit/ETT Lösung 1:1 0,272 ml	180 sec	1 µmol
	Amidit/ETT Lösung 1:1 0,448 ml	280 sec	10 µmol
1. Capping	CapA/CapB Lösung 1:1 0,304 ml	30 sec	1 µmol
	CapA/CapB Lösung 1:1 0,960 ml	60 Pulse	10 µmol
Oxidation	Oxidizer 0,640 ml	30 sec	1 µmol

	Oxidizer 1,2 ml	45 sec	10 μ mol
2. Capping	CapA/CapB Lösung 1:1 0,112 ml	7 Pulse	1 μ mol
	CapA/CapB Lösung 1:1 0,960 ml	60 Pulse	10 μ mol

2.2.2 RNA-Entschützung

Die Entschützung der RNA-Rohprodukte erfolgte nach Wincott, jedoch wurde das Protokoll in einigen Punkten leicht modifiziert (Wincott et al., 1995).

Im Anschluss an die Synthese wurde das Rohmaterial (1 μ mol oder 10 μ mol) zunächst mit 1,6 ml der Entschützungslösung von der festen Phase abgespalten. Diese bestand aus einer 41%igen Methylaminlösung in Wasser (Fluka) und einer 33%igen Methylaminlösung in Ethanol (Fluka) im Verhältnis 3:1 (v/v). Dazu wurde eine 2 ml Einwegspritze mit der Entschützungslösung gefüllt und auf die Synthesäule aufgesteckt. Eine zweite Spritze wurde am anderen Ende befestigt und die Entschützungslösung mehrmals durch die Säule hin und her gedrückt. Der Ansatz wurde dann mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur so belassen, jedoch alle 20 min nochmals gemischt. Diese basische Behandlung bewirkte gleichzeitig eine Abspaltung der Amino-Schutzgruppen der Nukleobasen sowie die Abspaltung der Cyanoethylschutzgruppe am Phosphat (siehe Abb. 2.2). Bei den Zucker-konjugierten RNA-Strängen wurde mit einer 33%igen NH_4OH Lösung gearbeitet und die RNA 16 h bei RT vom Trägermaterial abgespalten. Anschließend wurde die RNA-Lösung in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und das Lösungsmittel ü.N. in einem Speed Vac Concentrator 5301 von Eppendorf verdampft.

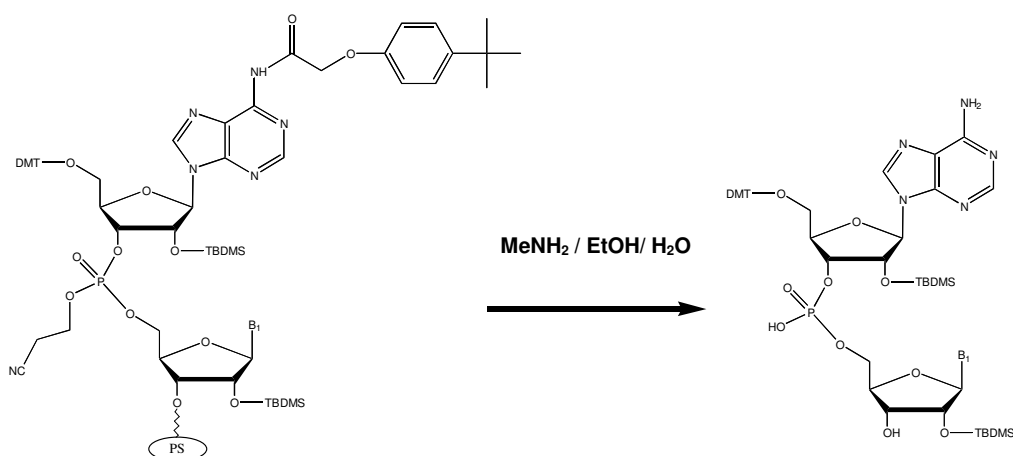


Abbildung 2.2: Chemische Darstellung der Basenentschützung und Abspaltung der RNA vom Trägermetriol am Beispiel eines TAC-geschützten Adenosins.

Für die 2'-Desilylierung (siehe Abb. 2.3) wurde das erhaltene RNA-Pellet in 125 µl N-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP), 60 µl Triethylamin (TEA) und 80 µl Triethylamin-trihydrofluorid (TEA₃HF) aufgenommen und 90 min bei 65°C unter leichtem Schütteln (650 rpm) in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Bei einer Synthese im 10 µmol Maßstab wurden die doppelten Mengen eingesetzt. Danach wurden 25 µl 3 M NaOAc und 1 ml 1-Butanol zugegeben und die RNA für mindestens eine Stunde bei -80°C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13200 rpm für 15 min bei 4°C, um die RNA zu pelletieren. Das Pellet wurde einmal mit 500 µl 85%igem Ethanol gewaschen und es wurde erneut für 5 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die RNA in 950 µl MilliQ Wasser resuspendiert und schließlich die Konzentration durch Absorptionsmessung bei 260 nm mit einem Spektrophotometer (DU 640B, Beckman Coulter) ermittelt. Die Zucker-konjugierten-RNA-Stränge wurden nach der 2'-Desilylierung nicht gefällt, sondern gequenchet. Dazu wurden nach dem Temperaturschritt 1,5 ml NMP und 1 ml Trimethylethoxysilan (Me₃SiOEt) zugegeben und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 ml Diethylether zugegeben und bei 2500 rpm und 4°C 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und zum Abschluss in 950 µl MilliQ Wasser aufgenommen.

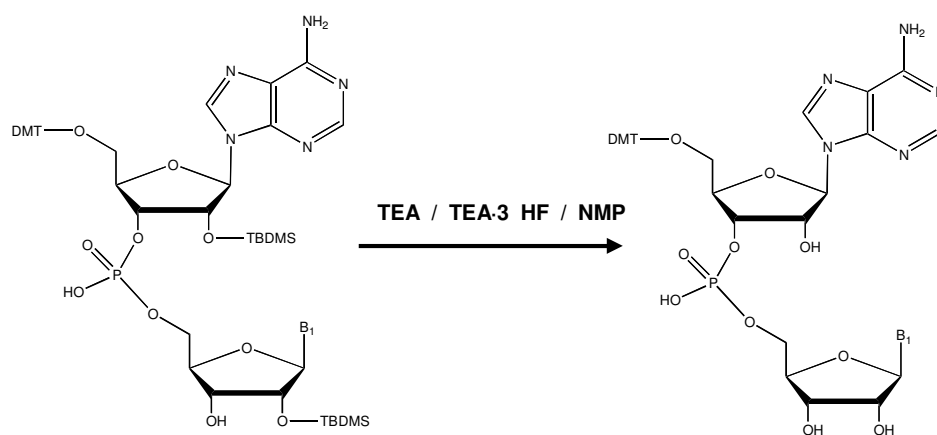


Abbildung 2.3: Chemische Darstellung der 2'-Desilylierung am Beispiel eines Adenosins.

2.2.3 Postsynthetische Kopplungen

Zur Kopplung von Aminen und Dipeptiden wurde zunächst am 5'-Ende des Sense Stranges, während der Festphasensynthese, ein C₁₀-NHS-Linker (ChemGenes, siehe Tab.2.3) eingeführt. Dieser enthält eine N-Succinimid-aktivierte Säuregruppe (siehe Abb. 2.4). Nach Zugabe eines Amins wurde eine Amidbindung geknüpft (siehe Abb. 2.4), die unter den verwendeten Entschützungsbedingungen (siehe Abschnitt 2.2.2) stabil blieb. Das Amin/Dipeptid wurde in dreißigfachem Überschuss zur RNA mit Hilfe zweier Spritzen mehrmals durch die Synthesäule hin und her gedrückt. Der Ansatz wurde bei RT ü.N. so belassen. Für die verschiedenen Amine und Dipeptide wurden unterschiedliche Lösungsmittelzusammensetzungen verwendet. Eine Auflistung ist Tabelle 2.6 zu entnehmen.

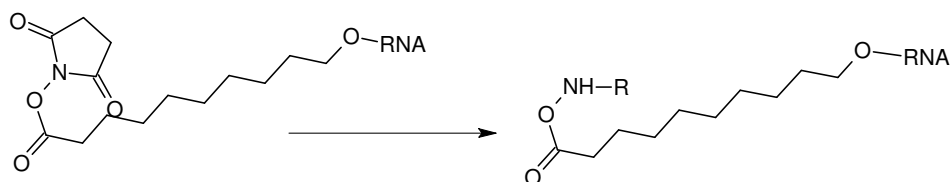


Abbildung 2.4: Amidbindungsknüpfung zwischen NHS-Ester-RNA und Amin

Tabelle 2.6 :Auflistung der verwendeten Amine und Dipeptide, das verwendete Lösungsmittelgemisch sowie die Mengenangaben

Amin/Dipeptid	Abkürzung	Lösungsmittel
Cycloheptylamin	Cylohep	1,0 ml DCM/0,3 ml TEA pH 7.5
Cyclododecylamin	Cyclodod	1,0 ml DCM/0,3 ml TEA pH 7.5
Dehydroabietylamin	Deh	1,0 ml DCM/0,3 ml TEA pH 7.5
2,3-Dimethoxyphenylethylamin	Dimthoxy	1,0 ml DCM/0,3 ml TEA pH 7.5
2,2-Diphenylethylamin	Diphenyl	1,0 ml DCM/0,3 ml TEA pH 7.5
3,4-Dibutylaminopropylamin	Dibutyl	1,0 ml DCM/0,3 ml TEA pH 7.5
Arginin	Arg	1.0 ml 0,1 M Boratpuffer pH 8.5
Glycyl-L-Phenylalanin	GlyPhe	0,8 ml MeOH/0,5 ml TEA pH 8.0
Glycyl-L-Tyrosin	GlyTyr	0,8 ml MeOH/0,5 ml TEA pH 8.0
Glycyl-L-Leucin	GlyLeu	1.0 ml 0,1 M Boratpuffer pH 8.5
Alanyl-Histidin (Carnosin)	Carn	1.0 ml 0,1 M Boratpuffer pH 8.5

Im Anschluss wurde die Reaktionslösung verworfen und die Synthesekartusche zweimal mit 8 ml DCM gespült und anschließend getrocknet. Folgend wurde wie unter 2.2.2 beschrieben verfahren, die RNA von der festen Phase abgespalten sowie die 2'-Desilylierung durchgeführt.

2.2.4 MALDI-TOF und LC-MS

Zur Analyse des synthetisierten Rohmaterials wurde von allen Proben zunächst die Masse mittels MALDI-TOF oder LC-MS ermittelt. Für die MALDI-TOF Analysen wurde ein Autoreflex LRF Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics (Bremen) verwendet. Als Steuerungssoftware diente das Programm flex Control 2.2 und die Auswertung erfolgte mit Hilfe von flex Analysis 2.2. Die Matrix setzte sich aus 100 µl 3-Hydroxypiccolinsäure (20 mg/ml in MilliQ Wasser) und 10 µl Ammoniumcitrat dibasisch (20mg/ml in MilliQ Wasser) zusammen.

Zunächst wurden 0,5 µl Matrix auf eine Trägerplatte (MTP Anchor Chip™, var/384 TF, Bruker Daltonics) aufgebracht und getrocknet. Auf die kristalline Matrix wurden

anschließend 0,5 µl Probe einer Lösung von 0,01 OD₂₆₀/ml gegeben und ebenfalls getrocknet.

Die LC-MS Messungen wurden auf einem gekoppelten System, bestehend aus der EttanµLC von Amersham Biosciences und dem Massenspektrometer LC-Q DECA XP Plus von Thermo Finnigan, durchgeführt. Das Massenspektrometer verfügte über eine ESI (Electrospray-Ionisation)-Quelle und die Detektion erfolgte über eine Ionenfalle.

Sämtliche Messungen und Analysen wurden von der Analytik-Abteilung der Firma Alnylam Europe AG durchgeführt.

HPLC Parameter der LC-Analyse:

Das Laufmittel für die HPLC setzte sich folgendermaßen zusammen. In 956,2 ml MilliQ Wasser wurden 41,5 ml HFIP und 2,3 ml TEA gelöst. Anschließend wurde die Lösung im Ultraschallbad für 20 min entgast. Die Auswahl der Säule und die chromatographischen Parameter waren eine Weiterentwicklung von Gilar (Gilar et al., 2003).

Säule: RP-Säule XTerra C8-MS, 2,5 µm Partikelgröße, 2,1 x 50 mm (Waters GmbH, Eschborn)

Temperatur: 60 °C

Detektion: 254 nm

Fluss: 0,2 ml/min

Laufmittel A: 400 mM Hexafluoroisopropanol (HFIP), 16,3 mM TEA in Wasser, pH 7.9

Laufmittel B: 100 % Methanol (LC-MS grade)

MS-Bedingungen:

Die ESI-MS wurde mit einer Zeitverzögerung von 3 min zur Injektion auf der HPLC gestartet, um das Massenspektrometer vor nicht adsorbierenden Substanzen, wie zum Beispiel Salzen, zu schützen. Als Standardmessmethode wurde der Total Ion Current (TIC) verwendet. Die Detektion erfolgte hierbei über den gesamten Ionenstrom mit einem SCAN-Bereich von m/z = 900 bis 2000.

2.2.5 Analytische HPLC

Für die Analytik der synthetisierten Einzelstränge mittels Ionenaustausch (IEX) wurden zwei HPLC-Systeme der Firma Dionex GmbH (Idstein) verwendet.

Das erste vollinerte Bio-LC-System war mit einem Inline-Degasser, einem AS 50 Autosampler, einer GS 50 Gradientenpumpe, einem TCC-100 Säulenofen sowie einem UV-Detektor (UVD 170U) ausgestattet. Die Systemsteuerung und die Auswertung erfolgten mit der Chromeleon Version 6.5 Software.

Das zweite Summit System setzte sich aus einem Solvent Rack SOR-100, einem ASI-100 Autosampler, einer P680 Gradientenpumpe, einem TCC-100 Säulenofen und einem Fest-UV Detektor (UVD 170U) zusammen. Systemsteuerung und Auswertung wurden hier mit der Software Chromeleon Version 6.6 durchgeführt.

Alle RNA-Einzelstränge wurden auf der Anionenaustauschersäule DNA Pac PA-100 (4 x 250 nm) der Firma Dionex analysiert. Die Flussrate der analytischen Läufe betrug 1ml/min und die Detektion erfolgte bei 260 nm.

Das Laufmittel setzte sich aus zwei Komponenten zusammen, die während des Gradienten von 12 % bis 35 % an Laufmittel B im entsprechenden Verhältnis gemischt wurden. Die Temperatur betrug bei allen Läufen 75 °C. Nach Beendigung eines jeden Laufs wurde die Säule mit 100% Laufmittel B gespült und anschließend wieder auf die Startbedingung von 12% Laufmittel B zurück gebracht.

Laufmittel A: 10 mM NaClO₄, 10% ACN, 1 mM EDTA, 25 mM TRIS, pH 8.0

Laufmittel B: 800 mM NaClO₄, 10% ACN, 1 mM EDTA, 25 mM TRIS, pH 8.0

2.2.6 Präparative HPLC

Je nach Anforderung an das Trennproblem, also je nach 5'-Modifikation der RNA-Einzelstränge, wurden verschiedene HPLC-Systeme und Trennmethode verwendet. Genaue Angaben zu den verwendeten Methoden sind Tabelle 2.7 zu entnehmen.

Tabelle 2.7: Überblick der verwendeten HPLC-Methoden, Geräte, Laufmittelbedingungen, Säulen, sowie Gradienten und Flussgeschwindigkeiten für die verschiedenen Konjugate.

Amide und Dipeptide	
Gerät	Explorer 10 (Amersham Biosciences)
Säule	XTerra 10x50 mm Prep MS C ₈ , 5 µm Reversed Phase Material (Waters)
Laufmittel	A: 100 mM TEAA pH 7.0 B: 100 mM TEAA pH 7.0, 95% ACN
Gradient	5 bis 80% Laufmittel B in 15 Säulenvolumen (SV)
Flussgeschwindigkeit	3,5 ml/min
Steroid-ähnliche Komponenten	
Gerät	Purifier 10 und Purifier 100 (Amersham Biosciences)
Säule	Kronlab 15x125 mm, Source 15Q, 15 µm Polystyren Reversed Phase Material (Kronlab)
Laufmittel	A: 5 mM Na ₂ HPO ₄ , 5 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.86 B: 5 mM Na ₂ HPO ₄ , 5 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.86, 65% ACN
Gradient	10 bis 100% Laufmittel B in 30 SV
Flussgeschwindigkeit	8,5 ml/min
Zucker	
Gerät	Purifier 100 (Amersham Biosciences)
Säule	Dionex 22x250 mm DNA Pac PA 100, 13 µm Anionenaustauschmaterial (Dionex)
Laufmittel	A: 10 mM NaClO ₄ , 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 6 M Harnstoff pH 7.4 20% ACN B: 800 mM NaClO ₄ , 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 6 M Harnstoff pH 7.4 20% ACN
Gradient	20 bis 50% Laufmittel B in 40 SV
Flussgeschwindigkeit	4,5 ml/min bzw. 8,5 ml/min

2.2.7 Entsalzung

Je nach Art der präparativen Reinigung der RNA-Einzelstränge wurden verschiedene Entsalzungsmethoden verwendet. Wurde über Reversed Phase gereinigt, so wurden die gesammelten Fraktionen zunächst auf 1 ml am Rotationsverdampfer eingeeengt

und anschließend über NAPTM-Säulen (Säulenmaterial Sephadex G-25 medium, DNA Grade) der Firma Amersham Biosciences entsalzt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

Bei Fraktionen, die eine optische Dichte bei 260 nm > 30 enthielten, wurde zunächst durch Eindampfen das Acetonitril entfernt und anschließend, durch Gelfiltration mit dem Äkta Prime System von Amersham und einer Sephadex HiPrepTM 26/10 Säule, entsalzt. Als Laufmittel wurde Wasser verwendet und die Flussgeschwindigkeit betrug 9 ml/min. Zum Abschluss wurden alle Fraktionen vereinigt, auf 1 ml eingengt und die optische Dichte bei 260 nm bestimmt.

Bei Reinigung über Anionenaustauschchromatographie bot sich eine Fällung des isolierten Produkts an. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt, so dass sich pro Fällungsansatz ein Volumen von 12,5 ml ergab. Bei geringerem Volumen wurde entsprechend mit MilliQ Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 41,5 ml einer 3 M NaOAc Lsg in 85%igem Ethanol zugegeben und die RNA ü.N. bei -20 °C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 2500 rpm für 1 h bei 4 °C. Das Pellet wurde in 10 ml 85%igem Ethanol aufgenommen und erneut bei gleichen Bedingungen für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das trockene Pellet in 1 ml MilliQ Wasser gelöst. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt.

2.2.8 UV-spektrometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach Entsalzung der RNA-Einzelstränge wurde anhand der optischen Dichte die Konzentration bestimmt. Dazu wurde mit dem Spektrophotometer 640B der Firma Beckman Coulter die optische Dichte bei 260 nm, gegen MilliQ Wasser als Referenz, gemessen. Bei der Berechnung des Extinktionskoeffizienten ϵ wurde angenommen, dass die 5'-Modifikationen sowie die Phosphorothioate und die Ribosefunktionalitäten keinen Beitrag zur Extinktion bei 260 nm leisten. So konnte über das Lambert Beer'sche Gesetz

$$A_{260} = \epsilon_{260} \cdot d \cdot c \quad (1)$$

mit der gemessenen Absorption bei 260 nm, der berechneten Extinktion ϵ und der Schichtdicke der Küvette d in cm die Konzentration c (mol/l) der RNA in wässriger

Lösung bestimmt werden. Mit bekanntem Volumen nach der Entsalzung lies sich somit ebenfalls die Ausbeute in nmol ermitteln.

Nach erfolgreicher Reinigung und Entsalzung wurden die Einzelstränge nochmals mittels IEX und LC-MS oder MALDI von der Analytik-Abteilung der Firma Alnylam Europe AG untersucht (siehe Kapitel 2.2.4 und 2.2.5) und nur zur weiteren Verwendung freigegeben, wenn die Einzelstränge die gesuchte Masse enthielten und zudem eine Reinheit von mindestens 85% aufwiesen.

2.2.9 Annealing-Protokoll zur Herstellung von RNA-Doppelsträngen

Nach Reinigung der Einzelstränge wurden diese mit dem entsprechenden Antisense Strang in einer Konzentration von 100 μM hybridisiert. Dazu wurden äquimolare Stoffmengen an Einzelstrang-RNA in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, 1/10 Volumenteil 10 x Annealing Puffer (1 M NaCl, 200 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6.8) zugegeben und auf ein Endvolumen von 200 μl mit MilliQ Wasser aufgefüllt. Sollte die Menge an Einzelstrang-RNA und Annealing Puffer ein Volumen von 200 μl überschritten haben, so wurden diese Ansätze ü.N. in einer Christ alpha loc Lyophylle in Kombination mit einer Zentrifuge RVC 2-25 von Christ zunächst vollständig eingedampft und dann komplett in 200 μl MilliQ Wasser aufgenommen. Die Ansätze wurden dann 3 min in einem 90°C temperierten Wasserbad inkubiert und durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Ausbildung einer Duplex-Struktur ermöglicht (John et al., 2005; John et al., 2003).

2.2.10 Übersicht der verwendeten RNA-Duplexe

In diesem Abschnitt sind die in dieser Arbeit verwendeten RNA-Duplexe aufgeführt, im Folgenden auch als siRNAs bezeichnet. Alle 5'-modifizierten Sense Stränge gegen die *apoB* und *bcl2* m-RNA wurden selbst hergestellt. Die komplementären Antisense Stränge, sowie 3'-Chol modifizierte Sense Stränge wurden von der Alnylam Europe AG zur Verfügung gestellt.

In Tabelle 2.8 sind zunächst die Codierungen der Sequenzen zusammengefasst.

Tabelle 2.8: Legende der verwendeten Symbolik und Übersicht der Modifikationen

Unmodifizierte Nukleinsäuren:		
● =	A	Adenosin
● =	C	Cytidin
● =	G	Guanosin
● =	U	Uridin
Modifizierte Nukleinsäuren:		
● =	a	Adenosin an der 2'-OH-Ribose Funktion mit OMe modifiziert
● =	c	Cytidin an der 2'-OH-Ribose Funktion mit OMe modifiziert
● =	g	Guanosin an der 2'-OH-Ribose Funktion mit OMe modifiziert
● =	u	Uridin an der 2'-OH-Ribose Funktion mit OMe modifiziert
Zucker-Phosphatrückgrat modifiziert:		
✓ =	S	Thiophosphodiester
Konjugat am 3'-Ende des Sense Stranges:		
● =	Chol	kovalent gebundenes Cholesterin am 3'-Ende

Alle *apoB* Stränge besitzen die gleiche Basenabfolge und basieren auf der unmodifizierten Grundsequenz apoB (siehe Abb. 2.5). Der Sense Strang dieser siRNA besteht aus 21 Nukleotiden und einer Phosphorothioat-Modifikation am 3'-Ende. Der Antisense Strang setzt sich aus 23 Nukleotiden zusammen, so dass ein 2 Nukleotid-Überhang am 3'-Ende entsteht. Der Antisense Strang enthält zwei O-Methyl-Modifikationen am 2'-OH der Ribose am 3'-Ende sowie zwei Phosphorothioate.

5'-	GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAsU	3'	Sense
3'-	Csas cAG UAG UGU GAC UUA UGG UU A	5'	Antisense

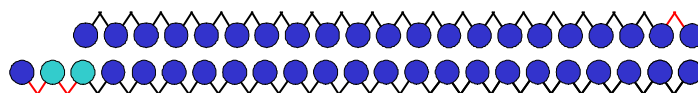


Abbildung 2.5: Sequenz und Kugelmodell der *apoB* siRNA

Alle selbst synthetisierten *apoB* Sense Stränge tragen eine zusätzliche Modifikation am 5'-Ende. In Abbildung 2.6 ist dies ebenfalls im Kugelmodell gezeigt.

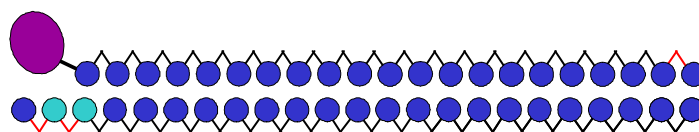
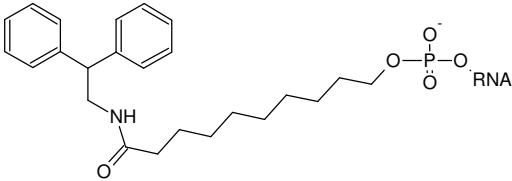
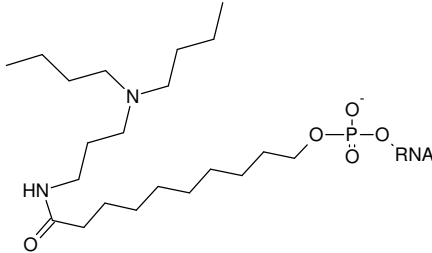
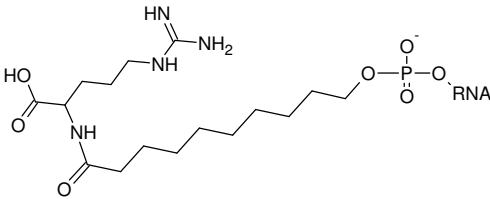
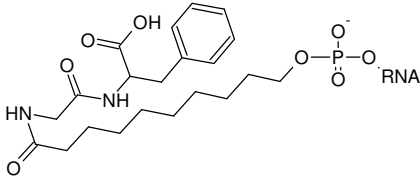
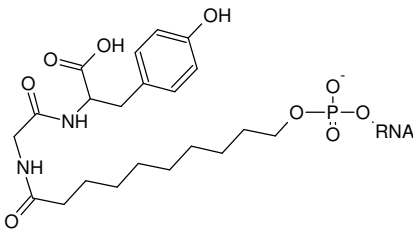
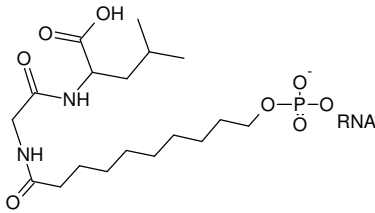


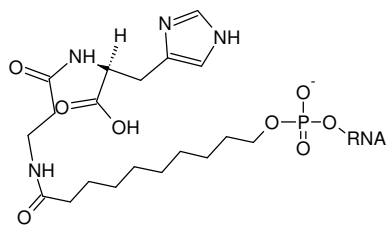
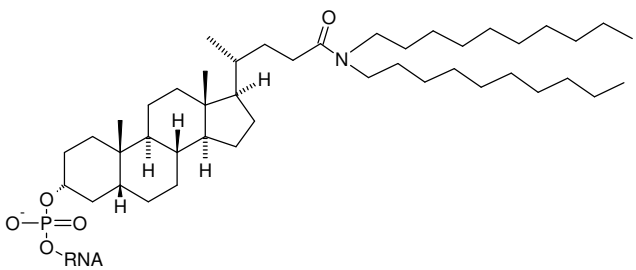
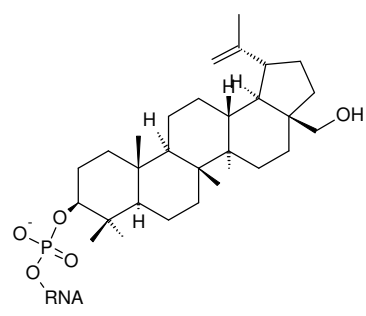
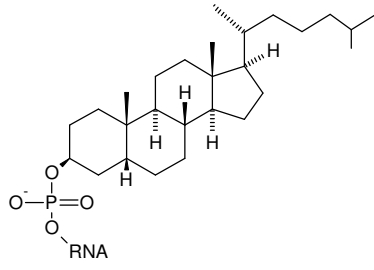
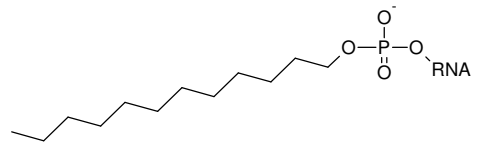
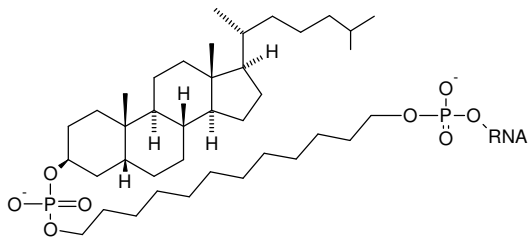
Abbildung 2.6: Kugelmodell einer *apoB* 5'-Sense modifizierten siRNA

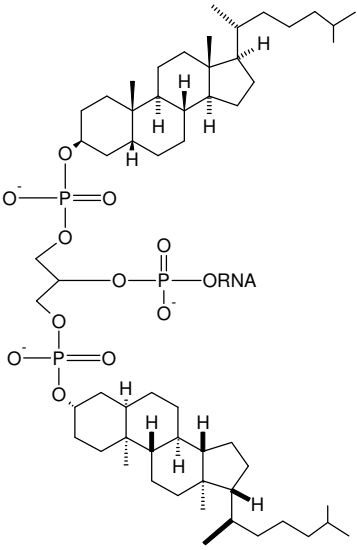
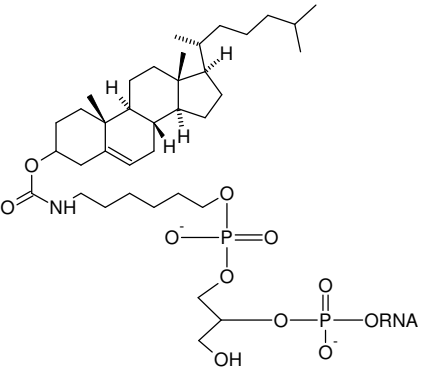
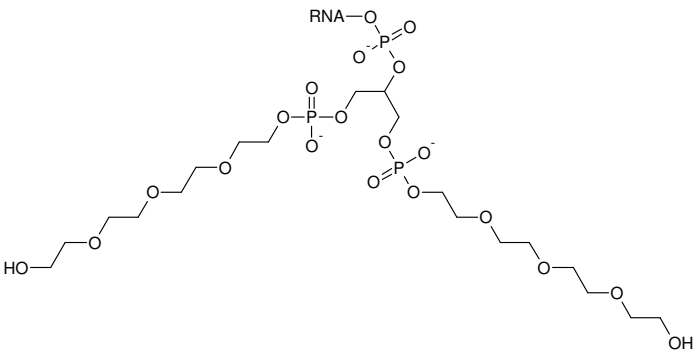
In der folgenden Tabelle 2.9 sind alle verwendeten 5'-Sense Modifikationen noch einmal mit Namen, Abkürzung und Strukturformel angegeben.

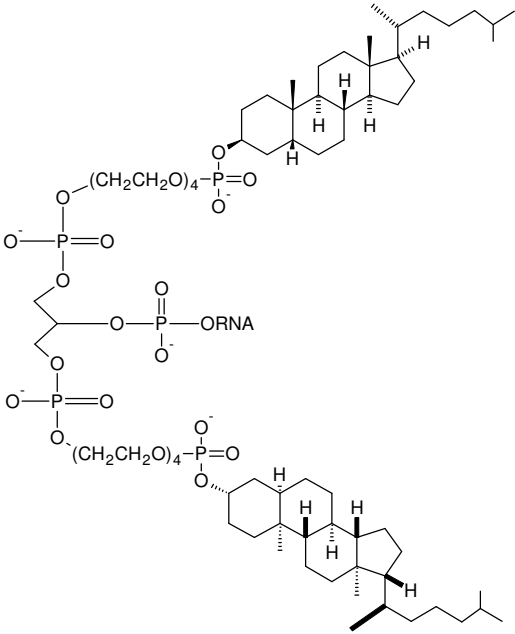
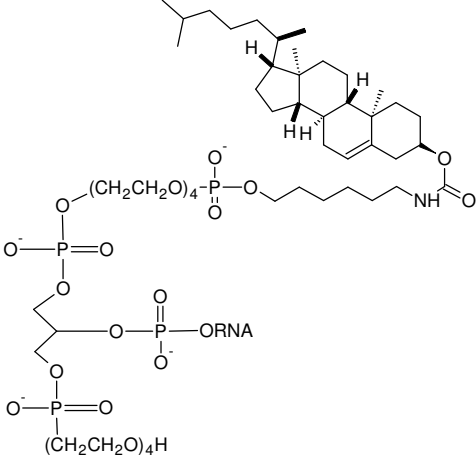
Tabelle 2.9: Übersicht der modifizierten *apoB* Sense Stränge mit Namen des Konjugates, Abkürzung und Strukturformel.

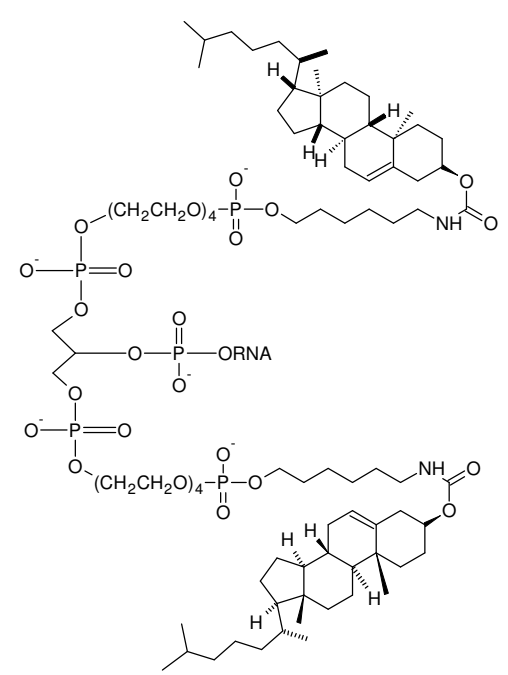
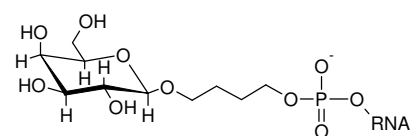
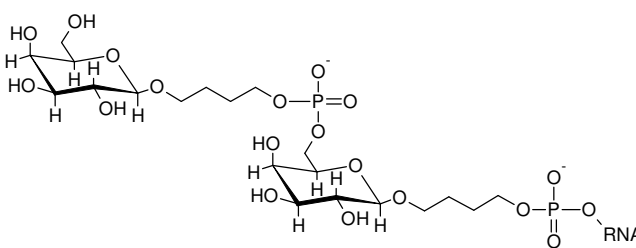
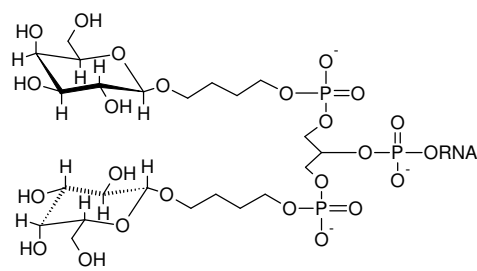
Name der konjugierten Gruppe	Abkürzung	Strukturformel
Cycloheptylamin	Cyclohep	
Cyclododecylamid	Cyclodod	
Dehydroabietylamin	Deh	
2,3 Dimethoxy-phenylethylamin	Dimethoxy	

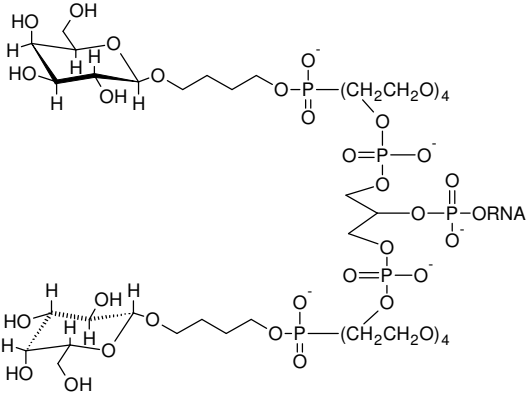
Name der konjugierten Gruppe	Abkürzung	Strukturformel
2,2 Diphenylethylamid	Diphenyl	
3,4 Dibutylaminopropylamid	Dibutyl	
Arginin	Arg	
Glycyl-L-Phenylalanin	GlyPhe	
Glycyl-L-Tyrosin	GlyTyr	
Glycyl-L-Leucin	GlyLeu	

Name der konjugierten Gruppe	Abkürzung	Strukturformel
Alanyl-L-Histidin (Carnosin)	Carn	
Lithocholsäure-di-n-decyl- amid	Litho	
Betulin	Bet	
3-Beta-Cholestanol	3BChol	
Dodecan	C12	
Dodecyl-3-Beta- Cholestanol	C123BChol	

Name der konjugierten Gruppe	Abkürzung	Strukturformel
2x 3-Beta-Cholestanol	SB3BChol	
1x Cholesterin	SB1xChol	
2x Tetraethylenglycol	SBTEG	

Name der konjugierten Gruppe	Abkürzung	Strukturformel
2x Tetraethylenglycol	SBTEG	
2x 3-Beta-Cholestanol	3BChol	
2x Tetraethylenglycol	SBTEG	
1x Cholesterin	1xChol	

Name der konjugierten Gruppe	Abkürzung	Strukturformel
2x Tetraethylenglycol	SBTEG	
2x Cholesterin	2xChol	
1x Galaktose	1xGAL	
2x Galaktose (linear)	2xGAL	
2x Galaktose (verzweigt)	SBGAL	

Name der konjugierten Gruppe	Abkürzung	Strukturformel
2x Tetraethylenglycol	SBTEGGAL	
2x Galaktose (verzweigt)		

Des Weiteren wurde eine 3'-Sense modifizierte Cholesterin siRNA verwendet, die als Kugelmodell in Abbildung 2.7 dargestellt ist. Außerdem ist die Strukturformel des 3'-Cholesterin-Konjugats gezeigt.

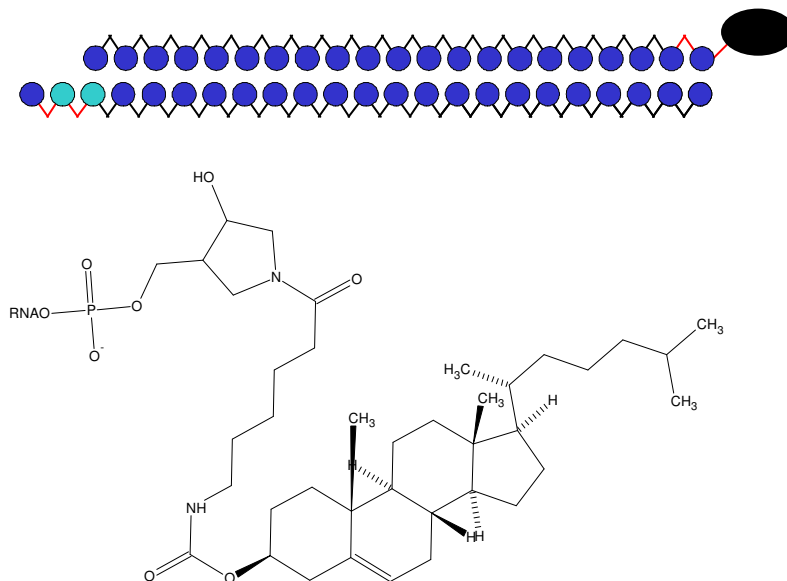


Abbildung 2.7: Kugelmodell einer 3'-Sense modifizierten siRNA gegen die *apoB* m-RNA sowie die Struktur der Cholesterin-Modifikation

Als sogenannte Negativkontrollen wurden siRNAs gegen die *bcl2* m-RNA und die nicht in den Zellen exprimierte *gfp*-m-RNA verwendet. Sie wurden nach ihrer 5'-bzw. 3'-Sense Modifikation *bcl2*SBGAL und *bcl2*SBTEGGAL sowie die unmodifizierte *bcl2*-Sequenz und die 3'-Cholesterin modifizierte *gfp*-Sequenz 3'-Cholgfp benannt.

Die Strukturen der Modifikationen sind Tabelle 2.9, sowie Abbildung 2.7 zu entnehmen. Die genauen Sequenzen sind in Abbildung 2.8 gezeigt.

<i>bcl2</i>	5'-	GGC CUU CUU UGA GUU CGG UGG	3'-	Sense
	3'-	CacCG GAA GAA ACU CAA GCC ACC	5'-	Antisense
<i>gfp</i>	5'-	CCA CAU GAA GCA GCA CGA CUU	3'-	Sense
	3'-	CugGU GUA CUU CGU CGU GCU GAA	5'-	Antisense

Abbildung 2.8: Sequenzen der verwendeten Kontroll-siRNAs gegen die *bcl2* und *gfp*-m-RNA.

2.2.11 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zum Nachweis von Doppelstrang-RNA wurde nach dem Annealing eine native Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Es wurden 10%ige Gele verwendet, bestehend aus 3,75 ml Acrylamid (40%ig, 19:1), 1,5 ml 1 x TBE, 9,75 ml MilliQ Wasser, 22,5 µl *N,N,N,N*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 45 µl einer 10%igen Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS). Als Laufpuffer wurde 0,8 x TBE eingesetzt. Der Vorlauf erfolgte 20 min ohne Proben bei 80 V. Anschließend wurden 1 µl dsRNA (100 µM) mit 6 µl nativem Probenpuffer (10 x BlueJuice, Invitrogen) versetzt und das Gel damit beladen. Der Hauptlauf erfolgte bei 100 V und wurde für 1 h und 15 min durchgeführt. Danach wurde das Gel für 30 min im Dunkeln in einer „Stains all“ Färbelösung (200 mg „Stains all“ von Sigma in 400 ml 1:1 (v/v) MilliQ Wasser/Formamid) geschwenkt und zur Entfernung der Hintergrundfärbung anschließend für 20 min in MilliQ Wasser entfärbt. In Abbildung 2.9 ist ein natives Gel dargestellt, auf dem 5'- und 3'-modifizierte sowie unmodifizierte siRNAs aufgetragen wurden.

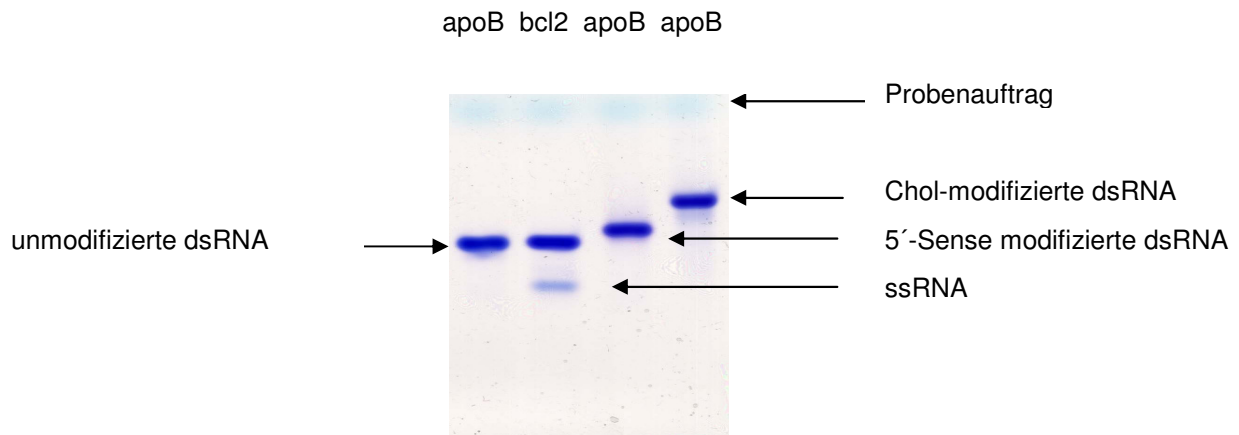


Abbildung 2.9: Qualitätskontrolle der dsRNA nach dem Annealing durch native Polyacrylamidgelelektrophorese.

Bei den oberen hellblauen Banden handelt es sich um den Probenaufrag, welcher als Rückstand des Auftragspuffers in den Taschen verbleibt. Die mit 3'-Cholesterin modifizierte siRNA zeichnet sich durch ihr kürzeres Laufverhalten aus, während völlig unmodifizierte Stränge deutlich weiter im Gel laufen. Eine 5'-Sense modifizierte Sequenz zeigt ebenfalls ein leicht kürzeres Laufverhalten als die unmodifizierte gleiche Sequenz (siehe Abb. 2.9). Teilweise sind unter den Doppelstrangbanden noch Rückstände von Einzelstrang-RNA zu erkennen. Diese kommen durch eventuelle Fehler bei der Konzentrationsbestimmung oder Pipettierungenauigkeiten zustande.

2.3 Biochemische Experimente

2.3.1 Arbeiten mit Zellkulturen

2.3.1.1 Zelllinien

Alle Experimente zur Untersuchung der posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression durch RNA-Interferenz wurden in HuH7 und MH7777A Zellen durchgeführt. Bei HuH7 Lorenzarbeit (JCRB Genbank, Japan) handelt es sich um eine humane Hepatoma Zelllinie, während MH7777A (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) eine von Buffalo-Ratten abgeleitete Hepatokarzinom-Zelllinie ist. Beide Zelllinien wachsen in polymorpher, runder Form sowie adherent in Monolayern. In Tabelle 2.10 sind alle verwendeten Medien und Lösungen für die Kultivierung der beiden Zelllinien zusammengefasst.

Tabelle 2.10: Für die Kultivierung von HuH7 und MH7777A verwendete Medien und Lösungen.

HuH7 (humanes Hepatokarzinom)	
Vollmedium	Dulbecco's MEM (Biochrom KG), zusätzlich mit 10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS), 1% (v/v) 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und 1% (v/v) 100 U/ml Penicillin G sodium/100 µg/ml Streptomycin sulfat (Biochrom)
Serumfreies Medium	Vollmedium ohne Zusatz von FCS
Sondermedium ohne CaCl ₂	Dulbecco's MEM (PAA) ohne CaCl ₂ , zusätzlich mit 10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS), 1% (v/v) 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und 1% (v/v) 100 U/ml Penicillin G sodium/100 µg/ml Streptomycin sulfat (Biochrom)
Serumfreies Medium ohne CaCl ₂	Sondermedium ohne CaCl ₂ ohne Zusatz von FCS
MH7777A (Rattenhepatokarzinom)	
Vollmedium	Dulbecco's MEM (Biochrom KG), zusätzlich mit 10% (v/v) Pferdeserum (DHS), 2% (v/v) 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und 1% (v/v) 100 U/ml Penicillin G sodium/100 µg/ml Streptomycin sulfat (Biochrom), 10 nM Insulin (Sigma) und 10 µM Dexamethason (Fluka, Zellkultur getestet)
Serumfreies Medium	Vollmedium ohne Zusatz von DHS
Sondermedium ohne CaCl ₂	Dulbecco's MEM (PAA) ohne CaCl ₂ , zusätzlich mit 10% (v/v) Pferdeserum (DHS), 2% (v/v) 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und 1% (v/v) 100 U/ml Penicillin G sodium/100 µg/ml Streptomycin sulfat (Biochrom), 10 nM Insulin (Sigma) und 10 µM Dexamethason (Fluka, Zellkultur getestet)
Serumfreies Medium ohne CaCl ₂	Sondermedium ohne CaCl ₂ ohne Zusatz von DHS
Für beide Zelllinien verwendete Lösungen	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O und 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4, steril)
Opti.MEM I	Medium mit reduziertem Serumanteil, ohne Phenolrot (Gibco, Invitrogen Cooperation)
Trypsin-Lösung	0,5% (w/v) Trypsin und 0,2% (w/v) EDTA in PBS mit Phenolrot versetzt (Gibco, Invitrogen)

2.3.1.2 Kultur der Zelllinien HuH7 und MH7777A

Beide Zelllinien wurden in Dulbecco's MEM Vollmedium (siehe Tab. 2.9) bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre in 94 x 16 mm Kulturschalen (Greiner BioOne) kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 (HuH7) oder 1:7

(MH7777A) zur weiteren Kultivierung passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS pro Kulturschale gewaschen. Anschließend wurde auf jede Platte 2 ml Trypsin-Lösung (siehe Tab. 3.9) gegeben und die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert, damit sie sich vom Boden der Kulturschale ablösen. Danach wurden die abgelösten Zellen mitsamt der Trypsin-Lösung in 10 ml Vollmedium resuspendiert und bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde sodann in der entsprechenden Menge Vollmedium resuspendiert und zum Animpfen von neuen Kulturen im Verhältnis 1:5, bzw. 1:7 wieder ausgesät.

2.3.1.3 Auftauen von Zelllinien

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen, wurden so schnell wie möglich bei 37°C aufgetaut und in 15 ml Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurden sie für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Auf 296 mm Kulturschalen wurden je 5 ml Vollmedium vorgelegt und weitere 5 ml der Zellsuspension zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 10 ml je Kulturschale ergab. Die weitere Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre, bis die Kulturschalen konfluent waren. Dann wurde wie unter Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben weiter vorgegangen und die Zellen passagiert.

2.3.1.4 Einfrieren von Zellkulturen

Von einer dicht bewachsenen Kulturschale wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin-Lösung zugegeben, und die Zellen bei 37°C von der Schale abgelöst. Sodann wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium aufgenommen und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet einer Kulturschale wurde in 2 ml Einfriermedium (ORIGEN, DMSO Freeze Medium, Igen International, Inc.) resuspendiert und in 1ml Aliquots in Kryopröhrchen (Nunc Cryo Tube Vials) überführt. Diese wurden in einer, mit Isopropanol gefüllten, Nunc Einfrierbox 2 Tage bei -80°C gelagert und danach in einen, mit flüssigem Stickstoff gefüllten, Zelltank überführt.

2.3.1.5 Transfektionsexperimente

Für die Transfektion der siRNA mit Oligofectamin (Invitrogen) wurden die Zellen 24 h zuvor im 96-well Maßstab ausgesät. Dabei wurde die Zellzahl so gewählt, dass am Tag der Analyse (b-DNA, ELISA) das well zu 90% konfluent bewachsen war. Mittels einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl/ml bestimmt und der Ansatz anschließend so verdünnt, dass 15000 Zellen/well der HuH7 Zellen und 10000 Zellen/well der MH7777A Zellen in 100 µl/well Vollmedium (siehe Tab. 3-9) ausgesät werden konnten. Einen Tag nach der Aussaat wurde das Medium von den Zellen abgenommen, diese einmal mit PBS gewaschen und 80 µl/well serumfreies Medium (siehe Tab. 2.9) zugegeben. In Tabelle 2.11 sind die Angaben für die siRNA und die entsprechende Menge Oligofectamin für einen 3-fach well-Ansatz gezeigt.

Tabelle 2.11: Schema für eine 3-fach Oligofectamin-Transfektion. Angegeben ist die Konzentration der siRNA, sowie die verwendete Menge an Oligofectamin und Opti-MEM I.

Konzentration der siRNA im well [nM]	100	10	1	0,1	mock
Vorverdünnung der siRNA					
Ausgangskonzentration [nM]	10000				
Konzentration der Vorverdünnung [nM]	2000	200	20	2	-
Verdünnung in Opti-MEM I [µl]	98	90	90	90	-
siRNA mit Ausgangskonzentration 100 µM [µl]	2				
Übertrag aus vorheriger Verdünnungsstufe [µl]		10	10	10	-
Berechnet für 3-fach Ansatz					
Vorverdünnung siRNA [µl]	17,5	17,5	17,5	17,5	-
Opti-MEM I [µl]	42	42	42	42	59,5
Oligofectamin in Opti-MEM I [µl]	1,8 plus 8,4	1,8 plus 8,4	1,8 plus 8,4	1,8 plus 8,4	1,8 plus 8,4

Zuerst wurden die siRNAs in entsprechender Konzentration vorverdünnt (siehe Tab. 2.10). Bei Einzeldosis-Experimenten wurde mit einer Endkonzentration von 100 nM siRNA gearbeitet, während bei Dosis-Wirkungs-Experimenten alle angegebenen Konzentrationen verwendet wurden. Anschließend wurde die Oligofectamin-

Verdünnung pipettiert und zum Abschluss die verdünnte siRNA zum Oligofectamin-Ansatz gegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur so belassen, damit sich ein Oligofectamin-siRNA-Komplex ausbilden konnte. Nachfolgend wurden 20 µl dieses Ansatzes in jedes well pipettiert, so dass das Gesamtvolumen/well 100 µl betrug. Die Zellen wurden dann 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 50 µl/well Vollmedium mit der dreifachen Menge an Serum (FCS oder DHS) zugegeben. Nach 24 h erfolgte ein kompletter Medienwechsel und nach 48 h die Analyse mittels b-DNA oder ELISA.

2.3.1.6 Inkubationsexperimente (ohne Transfektionshilfe)

Bei den Inkubationsexperimenten wurden die Zellen nicht, wie unter Punkt 2.3.1.5 beschrieben, einen Tag zuvor ausgesät, sondern erst kurz vor siRNA Zugabe (Direktinkubation). Die Zellzahl wurde ebenfalls mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellzahl/well auf 20000 (HuH7) und 10000 (MH7777A) eingestellt. Diesmal wurden die Zellen allerdings in 50 µl/well serumfreiem Medium ausgesät. Die siRNA wurde anschließend in entsprechender Konzentration direkt zu den Zellen pipettiert. Für Einzeldosis-Experimente wurde eine Konzentration von 10 µM/well gewählt und bei Dosis-Wirk-Beziehungen wurden 10 µM, 5 µM und 1 µM siRNA verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zuzugebende Menge an siRNA 5µl/well nicht überschreitet. Nach einer Inkubationsdauer von 4 h bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre wurden 50 µl/well Vollmedium mit dem doppelten Serumanteil zugesetzt und die Zellen für weitere 48 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein kompletter Medienwechsel.

Ein zusätzliches Inkubationsexperiment wurde mit Zellen durchgeführt, welche vorher für 2 Tage in Sondermedium (siehe Tab. 2.9) mit zusätzlich 5 mM CaCl₂ angezogen wurden. Ansonsten wurde wie bereits beschrieben verfahren.

Bei den durchgeführten Kompetitionsstudien wurde vor Zugabe der siRNA 1 mM N-Acetyl-Galaktosamin (Fluka) zu den Zellen gegeben und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss die siRNA zugegeben.

Des Weiteren wurden die Zellen mit siRNAs inkubiert, welche fluoreszierende Marker trugen. Für solche Aufnahmestudien wurden die Zellen 24 h vor Versuchsbeginn in Vollmedium ausgesät (HuH7, 15000 Zellen/well). Am Versuchstag wurde das

Medium von den Zellen abgenommen und gegen 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ serumfreies Medium ohne CaCl_2 ersetzt. Anschließend wurde die siRNA in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{M}/\text{well}$ zugegeben und die Zellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde Medium mit doppeltem Serumgehalt zugesetzt und die Zellen für 12 h bei 37°C und 5%iger CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 2.3.1.8).

2.3.1.7 Bestimmung der Zytotoxizität von siRNAs

Mit dem CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay der Firma Prologo können sowohl die zytotoxische Wirkung von bestimmten Substanzen auf zelluläre Systeme, als auch zellvermittelte Zytotoxizität gemessen werden. Werden Zellen durch bestimmte Substanzen, in diesem Fall siRNAs, geschädigt, verliert die Zellmembran ihre Integrität und es gelangen zytosolische Proteine in den extrazellulären Raum. Eines dieser Proteine ist die Laktatdehydrogenase (LDH), welche Laktat zu Pyruvat oxidiert. Bei dieser Reaktion werden Reduktionsäquivalente auf NAD übertragen und in einer weiteren enzymatischen Reaktion durch Diaphorese auf das zugegebene Substrat Resazurin (siehe Abb. 2.10). Dieses wird dadurch zu dem fluoreszierenden Resorufin reduziert. Diese Fluoreszenz (Ex_{max} 560 nm/ Em_{max} 590 nm) kann im Fluorometer gemessen werden, wobei die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zur Menge an freigesetzter LDH ist und damit zur Zahl geschädigter Zellen.

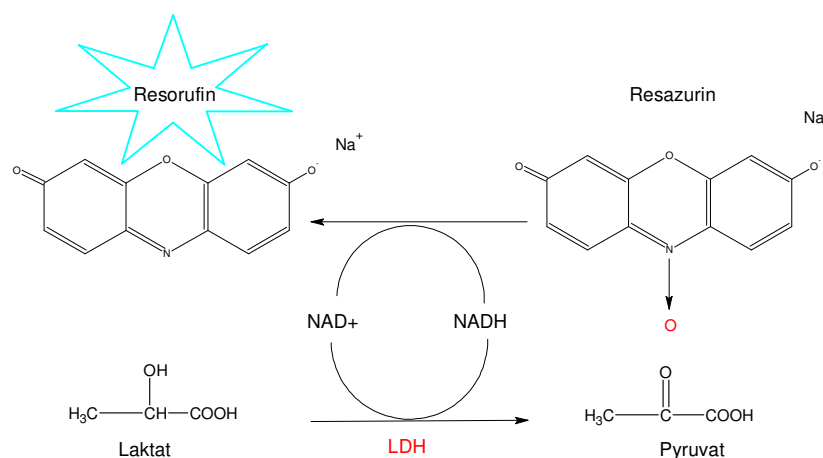


Abbildung 2.10: Chemische Darstellung der Reduktion von Laktat zu Pyruvat durch die LDH und gleichzeitige Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch die freiwerdenden Reduktionsäquivalente.

Die praktische Durchführung erfolgte 48 h nach Transfektion bzw. Inkubation. Es wurde dabei nach Herstellerangaben vorgegangen. Dazu wurden 11 ml des Assay Buffers in ein Substrat Vial pipettiert und gut gemischt. Davon wurden wiederum 50 μl /well in eine 96-Black-well Platte mit klarem Boden (Corning Incorporated) gegeben und mit 50 μl /well Zellüberstand aus einer Transfektion oder Inkubation vermischt. Es folgte eine Inkubation von 10 min unter Lichtausschluss und anschließend wurde die Fluoreszenz (Ex_{max} 560 nm/ Em_{max} 590 nm) im Multilabelcounter Victor 1420 der Firma Perkin Elmer gemessen. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die 30 min mit 10 μl /well der im Kit enthaltenen Lysis-Solution (0,1 M Triton X-100) behandelt wurden.

2.3.1.8 Aufnahmestudien mit fluoreszenz-markierter siRNA

Um eine Aufnahme der siRNAs in die Zellen zu beobachten, wurden verschiedene Sense Stränge mit einem Cy3-markierten Antisense Strang hybridisiert und die Zellen damit inkubiert (siehe Abschnitt 2.3.1.6). Etwa 16 h nach siRNA Gabe, wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und zum Abschluss 100 μl /well Vollmedium zugegeben, um nicht aufgenommene, fluoreszierende siRNAs zu entfernen. Sodann wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX50) analysiert und mittels einer monochromen Kamera der Firma VisitronSystems GmbH (7.0 Monochrom w/o IR, Diagnostic Instruments) fotografiert. Dazu wurden die Zellen zunächst im Durchlicht mit 40facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend mit einem NIB Filter die Rotfluoreszenz bei Ex_{max} 547 nm/ Em_{max} 563 nm sichtbar gemacht. Mit Hilfe der MetaView Imaging Software (Visitron Systems GmbH) wurden anschließend die Aufnahmen farbig gestaltet. Im Anschluss wurden 10 μl /well einer 0,1 mg/ml konzentrierten Lösung des Kernfärbungsreagenz 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Sigma) zu den Zellen pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Sodann wurde das Medium von den Zellen entfernt, 2-mal mit PBS gewaschen und 100 μl /well Vollmedium zugegeben. Die Aufnahme der Blaufluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines NB-Filters bei 365 nm und einer 40fachen Vergrößerung. Zum Abschluss wurden die Aufnahmen der Rot- und Blaufluoreszenz übereinandergelegt (MetaView Software, Firma), um den Zellkern innerhalb der Rotfluoreszenz sichtbar zu machen.

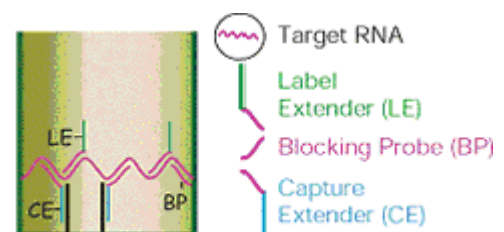
2.3.2 Nachweis von m-RNA mittels b-DNA

2.3.2.1 Theoretischer Hintergrund

Die sogenannte b-DNA Methode (branched DNA) der Firma Genospectra stellt eine neue Methode zum Nachweis von m-RNA dar, ohne diese aufwendig aus den Zellen isolieren zu müssen (Collins et al., 1997). In einem ersten Schritt werden die Zellen lysiert, wobei die Gesamt-m-RNA freigesetzt wird. Durch spezifische kurze Oligodesoxynukleotide, welche am Boden der sogenannten Capture Plate aufgebracht sind, wird beim Überführen des Lysats auf diese Platten und gleichzeitiger Zugabe von CE's (Capture Extender) die Ziel-m-RNA „gefischt“, da die CE's sowohl am Boden der Platte, als auch an der Ziel-m-RNA hybridisieren (siehe auch Abb. 2.11). Die ebenfalls zugegebenen und eigen ausgesuchten Label Extender (LE's) binden wiederum an verschiedene Sequenzen der Ziel-m-RNA, während die Blocking Probes (BP's) mit nicht gebundenen Bereichen der m-RNA hybridisieren. Bei Zugabe der Amplifier werden diese an die freie Sequenz der Label Extender gebunden. Diese Amplifier besitzen wiederum 15 Verzweigungen mit je 3 Kopien einer Sequenz, welche komplementär zur Label Probe sind. Damit können also 45 Label Probes an einen Amplifier binden und so das m-RNA Signal verstärken. Die Label Probes sind kovalent an Alkalische Phosphatase gebunden und bei Zugabe des Chemilumineszenz-Substrats Dioxetan wird dieses gespalten und zerfällt in ein instabiles, angeregtes Phenolat-Anion, welches beim Zurückfallen in den Grundzustand Licht aussendet (siehe Abb.2.12). Diese Lumineszenz kann bei 466 nm mit einem Luminometer (Victor™ light, Perkin Elmer) gemessen werden. Das gemessene Licht ist demnach proportional zur Ziel-m-RNA.

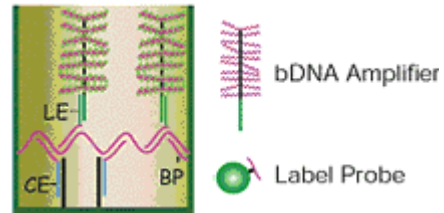
Schritt 1:

Durch Lyse der Zellen wird die Ziel m-RNA freigesetzt und auf die Capture Plate übertragen. Durch die CE's, welche an der Ziel m-RNA und der am Boden der Platte aufgetragenen Sequenz hybridisieren, wird die gewünschte m-RNA „gefischt“. LE's und BP's binden ebenfalls an die Ziel-m-RNA.



Schritt 2:

Durch Zugabe von Amplifiern, welche an den LE-Sequenzen hybridisieren und Label Probes, die wiederum an die Amplifier binden, wird eine Verstärkung des m-RNA Signals erreicht.



Schritt 3:

Das zugegebene Chemilumineszenz-Substrat wird durch die Alkalische Phosphatase an den Label Probes gespalten und erzeugt eine Lumineszenzreaktion. Das ausgesendete Licht ist demnach proportional zur gebundenen m-RNA.

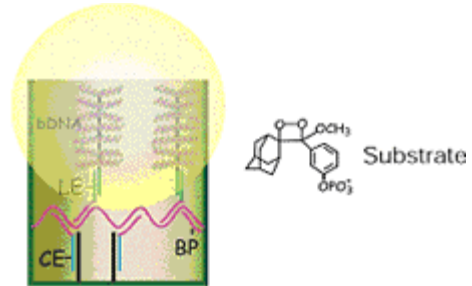


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der b-DNA Methode zum Nachweis von m-RNA. Gezeigt sind die einzelnen Schritte der Hybridisierung, bis hin zur Signalamplifikation.

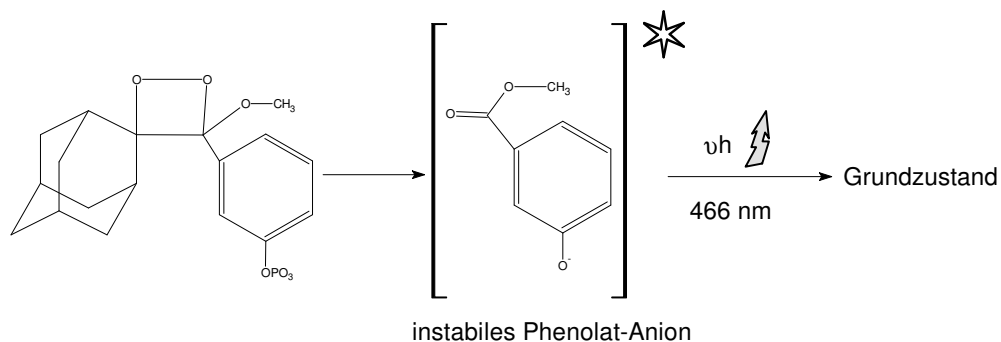


Abbildung 2.12: Chemische Darstellung der beim b-DNA ablaufenden Chemilumineszenz-Reaktion. Vom Substrat Dioxetan wird durch Alkalische Phosphatase das Phosphat abgespalten, wodurch es zum Zerfall des Substrats in ein instabiles, angeregtes Phenolat-Anion kommt. Dieses fällt unter Aussendung von Licht in den Grundzustand zurück.

2.3.2.2 Praktische Durchführung

In Tabelle 2.12 sind alle im Kit enthaltenen Lösungen und Materialien aufgeführt, sowie die selbst bereitzustellenden Komponenten.

Tabelle 2.12: Überblick der im Kit enthaltenen Bestandteile und selbst bereitzustellenden Materialien und Lösungen.

Kitbestandteile	Benötigte Materialien und Lösungen
Lysispuffer (pur)	Sterile Flüssigkeitsreservoirs (Cornig Incorporated)
Amplifier und Label Diluent	Sterile und Nukleasefreie Pipettenspitzen (Eppendorf)
Amplifier und Label Probe	PCR-Folien für 96-well Platten (Eppendorf)
Substrat	Klarsichtfolien für 96-well Platten (Excel Scientific Inc.)
96-well Capture Plates	10% (w/v) Lithiumlaurylsulfat (Sigma) in MilliQ Wasser
	20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat pH 7.0) in MilliQ Wasser
	Nuklease-freies Wasser (Ambion)
	1 x TE (10 mM Tris/HCl, pH 7.5-8.0 ; 1 mM EDTA pH 7.5-8.0)

Zur Vorbereitung wurde zuerst ein sogenannter Sondenpool einmal für das Target (*apoB*) und für *gapdh* (Referenz m-RNA) erstellt, bestehend aus CE's (Capture Extender), LE's (Label Extender) und BP's (Blocking Probes). Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

CE Pool:	2,5 µl von jedem CE in 5 ml 1xTE	(50 fmol/µl)
LE Pool:	10 µl von jedem LE in 5 ml 1xTE	(200 fmol/µl)
BP Pool:	5,0 µl von jedem BL in 5 ml 1xTE	(100 fmol/µl)

Die einzelnen CE's, LE's und BP's wurden zuvor mit der Genospectra Probe DesignerTM Software für die Ziel-m-RNAs ausgewählt und ebenfalls von der Firma Genospectra synthetisiert. Wie viele von jeder Art existieren, richtet sich nach der m-RNA Sequenz (siehe Tab. 2.13). Die einzelnen Pools wurden dann in 0,5 ml Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.13: Aufstellung der verwendeten CE's, LE's und BP's für die Ziel-m-RNA (*apoB*), sowie die Referenz m-RNA (*gapdh*). Angegeben sind der Name, die Funktion und die Sequenz.

HuH7 (human)		
Ziel-m-RNA <i>apoB</i>		
Name	Funktion	Sequenz
hApoB001	CE	gattggatttcagaatactgtatagctTTTTTctcttgaaagaaagt
hApoB002	CE	cctgctcgttgctgaggtTTTTTctcttgaaagaaagt
hApoB003	CE	gcagtgatggaagctgcgataTTTTTctcttgaaagaaagt
hApoB004	CE	gaacttctaatttgactctccttgTTTTTctcttgaaagaaagt
hApoB005	CE	actcctcagagccagcggTTTTTctcttgaaagaaagt
hApoB006	CE	actccatgctccgttctcaTTTTTctcttgaaagaaagt
hApoB007	CE	agggtaaagctgattgtttatctgaTTTTTctcttgaaagaaagt
hApoB008	LE	ggtccattccctatgtcagcaTTTTTaggcataggaccggtgtct
hApoB009	LE	attaatcttagggttgagagttgtTTTTTaggcataggaccggtgtct
hApoB010	LE	cactgtgttgatttccctcaataTTTTTaggcataggaccggtgtct
hApoB011	LE	tgtatttttctgtgtgtaaactgcTTTTTaggcataggaccggtgtct
hApoB012	LE	caatcactccattactaagctccagTTTTTaggcataggaccggtgtct
hApoB013	BP	tgccaaaagtaggtacttcaattg
hApoB014	BP	ttgcatctaattgaaaagagga
hApoB015	BP	catttgctgaaaatcaaaattga
hApoB016	BP	ggtactgctggagaactcactg
hApoB017	BP	gcatttccaaaaaacagcattc
Referenz-m-RNA <i>gapdh</i>		
Name	Funktion	Sequenz
hGAP001	CE	gaatttgccatgggtggaatTTTTTctcttgaaagaaagt
hGAP002	CE	ggagggatctcgctcctggaTTTTTctcttgaaagaaagt
hGAP003	CE	ccccagccttccatggtTTTTTctcttgaaagaaagt
hGAP004	CE	gctccccctgcaaatgagTTTTTctcttgaaagaaagt
hGAP005	LE	agccttgacggtgcatgTTTTTaggcataggaccggtgtct
hGAP006	LE	gatgacaagcttcccgttctTTTTTaggcataggaccggtgtct
hGAP007	LE	agatggtgatgggatttccattTTTTTaggcataggaccggtgtct
hGAP008	LE	gcacgccccacttgattttTTTTTaggcataggaccggtgtct
hGAP009	LE	cacgacgtactcagcgccaTTTTTaggcataggaccggtgtct
hGAP010	LE	ggcagagatgatgaccctttgTTTTTaggcataggaccggtgtct
hGAP011	BP	ggtgaagacgccagtggactc
MH7777A (Ratte)		
Ziel-m-RNA <i>apoB</i>		
Name	Funktion	Sequenz
rApoB001	CE	tgggagttcgagagcttgattTTTTTctcttgaaagaaagt
rApoB002	CE	agttttccaggagtgaggagaTTTTTctcttgaaagaaagt
rApoB003	CE	gggctttatttgagccaaacTTTTTctcttgaaagaaagt
rApoB004	CE	ccatttgataaattcgggtctcgtTTTTTctcttgaaagaaagt
rApoB005	CE	gctccagttcccctgaatgtTTTTTctcttgaaagaaagt
rApoB006	CE	tggccccagaaatgttggaTTTTTctcttgaaagaaagt
rApoB007	CE	agcttcttgagagcgtggaTTTTTctcttgaaagaaagt

rApoB008	LE	tcagcattgattctctgagtcacatctTTTTtaggcataggaccggtgtct
rApoB009	LE	cacagtttaaatgcttcagttttctgTTTTtaggcataggaccggtgtct
rApoB010	LE	catcctgcagccaatcaacgTTTTtaggcataggaccggtgtct
rApoB011	LE	tggttaccagagacaagcagcTTTTtaggcataggaccggtgtct
rApoB012	LE	gactgacctcaaatgcaggcaTTTTtaggcataggaccggtgtct
rApoB013	BP	ccgtgggtttgaagtcttctacc
rApoB014	BP	accacagttactttgggtgctctg
rApoB015	BP	acatcttctaagcatcttgaatt
rApoB016	BP	gtaggtgaccactgtgctgtaaact
rApoB017	BP	agtcagagtccaccagtcagaaat
rApoB018	BP	ctctgcaaagtctgttatgttttagc
rApoB019	BP	cccacttttgggtggaatattg
rApoB020	BP	ccaccagtgttcacactctcag
rApoB021	BP	tttcaggaacaatgaatcctgtt
rApoB022	BP	ggactataaagtcaggagtctgaaagtt

Referenz-m-RNA *gapdh*

Name	Funktion	Sequenz
rGAPD001	CE	ccagcttcccattctcagccTTTTTctcttgaaagaaagt
rGAPD002	CE	tctcgctcctggaagatggtTTTTTctcttgaaagaaagt
rGAPD003	CE	cccatttgatgttagcggaTTTTTctcttgaaagaaagt
rGAPD004	CE	cggagatgatgacccttttgTTTTTctcttgaaagaaagt
rGAPD005	LE	gatgggtttcccggtgatgaTTTTTtaggcataggaccggtgtct
rGAPD006	LE	gacatactcagcaccagcatcacTTTTTtaggcataggaccggtgtct
rGAPD007	LE	cccagccttctccatggtggTTTTTtaggcataggaccggtgtct
rGAPD008	BP	ttgactgtgccgttgaactg
rGAPD009	BP	tgaagacgccagtagactccac
rGAPD010	BP	cccacccttcaggtagc
rGAPD011	BP	ggcatcagcggaagggg

a, c, g, t = Hybridisierungsregion

TTTTT = Verbindung (Linker)

Der b-DNA Assay wurde an zwei Tagen durchgeführt. Am ersten Tag erfolgte die Lyse der Zellen und die Hybridisierung. Dazu wurde im Anschluss an die Transfektion das verbrauchte Medium von den Zellen abgenommen und gegen 100 µl/well Vollmedium ersetzt. Anschließend wurden 50 µl/well purer Lysispuffer zugegeben und die Zellen bei 53°C für mindestens 30 min lysiert. Je nach Zelltyp konnte dieser Prozess unterschiedlich lang dauern, daher wurde die vollständige Lyse immer mikroskopisch überprüft. Während dieser Zeit wurden eine entsprechende Anzahl an Capture Plates auf Raumtemperatur gebracht und die Sonden-pools aufgetaut. Dabei ist zu bedenken, dass pro Zellplatte zwei Capture Plates benötigt werden (Ziel-m-RNA und Referenz-m-RNA). In Tabelle 2.14 sind Angaben zur Erstellung der Sonden für eine Capture Plate getroffen.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung der Sonden für die Hybridisierung einer Capture Plate. Angegeben sind die Mengen für den CE-, LE- und BP-Pool, sowie der verwendete Puffer.

Capture Plates	Lysis Mix (1:3 verd. in Nuklease freiem Wasser)	CE 50fmol/ μ l	LE 200fmol/ μ l	BP 100fmol/ μ l	Total volume
1	850 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	1,0 ml

Nun wurden 40 μ l/well vom Lysis-Mix (Lysispuffer pur 1:3 (v/v) verdünnt in Nuklease-freiem Wasser) in den Capture Plates vorgelegt und anschließend 50 μ l/well vom Lysat sowohl auf die Target-Platte als auch auf die *gapdh*-Referenz-Platte gegeben und sorgfältig gemischt. Anschließend wurden 10 μ l/well der, nach Tabelle 2.12 zusammengestellten, Sonden hinzu pipettiert und die Platte mit einer PCR-Folie verschlossen. Um eine „feuchte Kammer“ zu erzeugen, wurden jeweils die zusammengehörigen Target- und *gapdh*-Platten in ein feuchtes Papiertuch gewickelt und in einen Plastiksack verpackt. Es folgte eine Inkubation bei 53°C für mindestens 16 h.

Am folgenden Tag fand die Signalamplifizierung und die Detektion der m-RNA statt. Dazu wurden die Capture Plates der Reihe nach aus dem Inkubator genommen und mittels automatischem Plattenwaschgerät (ColumbusPro, Tecan) dreimal mit je 200 μ l Waschpuffer/well (siehe Tabelle 2.14) gewaschen. Während des ersten Waschschriffs wurde die „Amplifier Working Solution“ (siehe Tabelle 2.14) vorbereitet und anschließend, nach sorgfältigem Ausklopfen der Platten auf Papiertüchern, 100 μ l/well auf die Capture Plates gegeben. Danach wurden die Platten mit Klarsichtfolie verschlossen und für 1 h bei 53°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten erneut, wie oben beschrieben, gewaschen und es wurden 100 μ l/well vom „Label Working Reagent“ (siehe Tab. 2.14) pipettiert und die Platten mit Klarsichtfolie verschlossen. Es folgte eine weitere Inkubationsstunde bei 53°C. Nach einem erneuten Waschen der Platten wurden 100 μ l/well des „Substrat Working Reagent“ (siehe Tab. 2.15) zugegeben und die Platten diesmal mit einer PCR-Folie bedeckt. Nach 30 min bei 53°C wurden die Platten etwa 10 min auf Raumtemperatur gebracht und anschließend im Luminometer (Wallac, Victor™ light, Luminescence Counter, Perkin Elmer) bei 466 nm vermessen. Für die Auswertung wurden die Werte der „Target-Platte“ auf die Werte der „Referenz-Platte“ normiert.

Tabelle 2.15: Zusammensetzung des verwendeten Waschpuffers, der Amplifier Working Solution, des Label Probe Working Reagent, sowie des Substrat Working Reagent. Die angegebenen Mengen beziehen sich immer auf eine Capture Plate.

Waschpuffer	2,5 ml 20 x SSC	1,5 ml 10% Lithium-Laurylsulfat	495 ml MilliQ Wasser
Amplifier Working Solution	10,5 ml Amplifier Probe Diluent		10,5 µl Amplifier Probe
Label Probe Working Reagent	10,5 ml Label Probe Diluent		10,5 µl Label Probe
Substrat Working Reagent	10,5 ml Substrat		31,5 µl 10% Lithium-Laurylsulfat

2.3.3 Arbeiten mit Protein

2.3.3.1 Gewinnung des Gesamtproteins aus einer Zellkultur

Für die Proteingewinnung mussten zunächst Lysate der Zellen hergestellt werden. Dafür wurden von einer konfluent bewachsenen 94 x 16 mm Platte die Zellen mit Hilfe einer Trypsin-Lösung abgelöst und in 1 ml TEDT-Lysispuffer (20 mM Tris pH 7.5, 2 mM EDTA, 500 µM EGTA, 1 mM DTT, 0,5% (v/v) Triton X-100, 1 Tablette Complete Proteinaseinhibitoren Cocktail von Roche) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min und anschließend wurde für 30 min bei 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert (Tischzentrifuge 4515R, Eppendorf). Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt.

2.3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Hierzu wurde zunächst eine Standard-Eichgerade von Rinderserumalbumin (BSA, Sigma) aufgenommen. Dazu wurden 200 µl der Verdünnung (0; 4; 12; 20; 28; 40; 60; 80 µg/ml) mit 800 µl Roti®-Nanoquant-Arbeitslösung von Roth versetzt, in eine 2,5 ml Plastikküvette (PMA-Einmalküvetten, Roth) überführt, nochmals gut gemischt und die Absorption bei 450 nm und 590 nm bestimmt (General Purpose UV/Vis Spectrophotometer DU520, Beckman Coulter). Für die Probenbestimmung wurden zu 10 µl Probe und 190 µl MilliQ Wasser 800 µl Arbeitslösung pipettiert und ebenfalls die Absorption bei 450 nm und 590 nm gemessen. Zur Bestimmung der

Proteinmenge wurde der Quotient 590/450 gegen die Proteinmenge BSA aufgetragen und aus der Geradengleichung der Eichreihe der Proteingehalt der Proben errechnet (Bradford, 1976).

2.3.3.3 Elektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde, wie bei Laemmli beschrieben, unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970). Dazu wurden von den hergestellten Zelllysaten (Abschnitt 2.3.3.1) jeweils 20 µg oder 40 µg mit 5 µl Proteinprobenpuffer (siehe Tab. 2.15) versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert und auf ein SDS-Gel (siehe Tab. 2.15) aufgetragen. Als Größenstandard wurden pro Gel 10 µl Kaleidoscope Prestained der Firma BioRad verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 25 mA für 1 h und 30 min mit 1 x SDS Laufpuffer (siehe Tab. 2.16) und einer Elektrophoresekammer der Firma Amersham Biosciences (Mighty Small II für 9x8 cm Minigele).

Tabelle 2.16: Aufstellung der für die SDS-Gelelektrophorese benötigten Reagenzien und Puffer. Angegeben ist die Konzentration der einzelnen Bestandteile.

Angaben für 4 8x9 cm Minigele	Sammelgel 5% (20 ml)	Trenngel 10% (60 ml)
MilliQ Wasser	13,6 ml	23,76 ml
30% Acrylamid-Mix (29:1, Roth)	3,4 ml	20,04 ml
1.0 M Tris pH 6.8	2,5 ml	
1,5 M Tris pH 8.8		15,00 ml
10% SDS	0,2 ml	0,6 ml
10% APS	0,2 ml	0,6 ml
TEMED	0,02 ml	0,024 ml
5 x SDS Laufpuffer	24,8 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, 192 mM Glycin, auf 1 x SDS Puffer verdünnen für Gellauf	
5 x Proteinprobenpuffer	8,0 ml MilliQ Wasser, 2,0 ml 0,5 M Tris pH 6.8, 1,6 ml Glycerin, 3,2 ml 10% (w/v) SDS, 0,8 ml β-Mercaptoethanol, 1 SpSp Bromphenolblau (Sigma)	

2.3.3.4 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)

Für den Transfer der elektrophoretisch getrennten Proteine (siehe Abschnitt 3.3.3.3) auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond™-C extra, Amersham Biosciences), wurde die sogenannte „semi-dry“ Methode verwendet. Dafür wurden Whatman-Filterpapiere (Schleicher&Schuell) verschiedener Dicke, das SDS-Gel sowie die Membran in unterschiedlichen Puffern (siehe Tab. 3-16) getränkt und in folgender Reihenfolge luftblasenfrei in die Blotting-Kammer (Hoefer SemiPhor™, Amersham Biosciences) geschichtet (siehe Abb.2.17) (Towbin et al., 1992; Burnette, 1981).

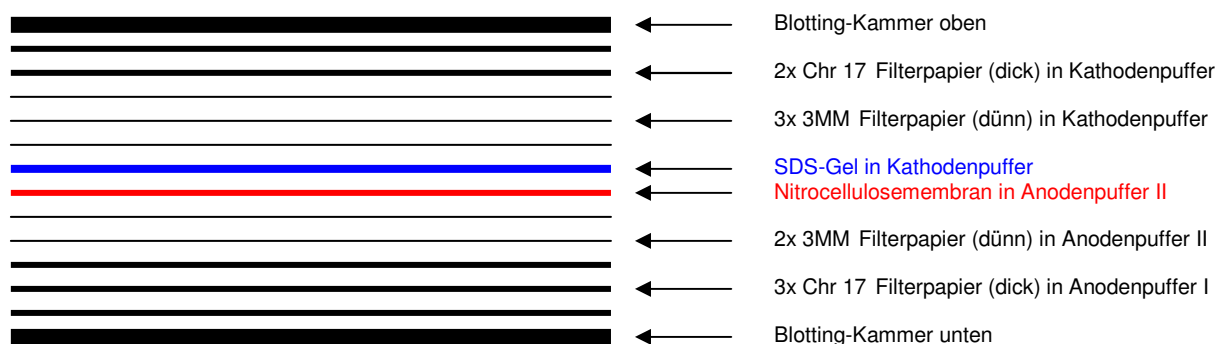


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der beim Western-Blot verwendeten Schichtung, sowie Puffer.

Je nach Anzahl und Größe der SDS-Gele wurde bei unterschiedlichen Ampere-Zahlen in 2 Phasen geblottet. Die Amperezahl lässt sich aus folgender Formel berechnen:

Phase I: 1 h bei $(a \text{ cm Gel} \times b \text{ cm Gel}) \times 0,4 \times \text{Membrananzahl} = x \text{ mA}$

Phase II: 1 h bei $(a \text{ cm Gel} \times b \text{ cm Gel}) \times 0,8 \times \text{Membrananzahl} = x \text{ mA}$

Da die in dieser Arbeit verwendeten Minigele die Maße 8 cm x 9 cm besaßen, wurde bei einem Gel in der ersten Phase mit 30 mA gearbeitet und in der zweiten Phase folglich mit 60 mA.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung der verwendeten Blotting-Puffer.

Anodenpuffer I	300 mM Tris pH 10.4, 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	30 mM Tris pH 10.4, 20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	40 mM ε-Aminocapronsäure, 0,01% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

5% Magermilchpuffer	12,5 g Magermilchpulver (Sucofin), 25 ml 10 x TBS, ad 250 ml MilliQ Wasser
10 x TBS	1,5 M NaCl, 0,2 M Tris pH 7.5

Im Anschluss an die Blotting-Prozedur wurde die Membran für 15 min in Ponceau Rot gefärbt, um einen gleichmäßigen Proteinübertrag sicherzustellen. Anschließend wurde die Hintergrundfärbung durch leichtes Schwenken in MilliQ Wasser entfernt und zur Dokumentation eine Kopie der Membran erstellt.

Bis zum Immunologischen Nachweis der membrangebundenen Proteine wurde die Membran in 5% Magermilchpuffer (siehe Tab. 2.16) eingelegt und bei 4°C maximal 16 h aufbewahrt.

2.3.3.5 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Nach Immobilisierung von Proteinen an Nitrocellulosemembranen können diese mit spezifischen primären Antikörpern nachgewiesen werden. Der Nachweis der spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch die Bindung eines zweiten, mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Anti-IgG-Antikörpers (Leary et al., 1983). Eine Übersicht der verwendeten Antikörper ist Tabelle 2.17 zu entnehmen. Durch anschließende Zugabe eines Substrat-Chromogen Gemisches kam es zu einer Farbreaktion bzw. Chemilumineszenz, welche durch einen Lumineszenzdetektor sichtbar wurde.

Zunächst wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpuffer geschwenkt, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde dreimal für 5 min mit je 100 ml 1 x TBSTween (siehe Tabelle 2.17) gewaschen und dann für 1 h der primäre Antikörper in 20 ml 1% Magermilchpuffer zugesetzt. Nach dieser Inkubation wurde erneut dreimal mit 1 x TBSTween gewaschen und die Membran nachfolgend mit dem sekundären IgG-Antikörper in 20 ml 1% Magermilchpuffer unter leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem die Membran erneut gewaschen wurde, erfolgte die Detektion mittels Supersignal West Pico Chemiluminescence Substrate der Firma Pierce. Dabei wurden die beiden Komponenten der Detektionslösung im Verhältnis 1:1 gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt, so dass etwa 100 µl/cm² Flüssigkeit die Membran bedeckten.

Diese wurde sofort ins Dunkel gebracht und für 5 min inkubiert. Danach wurde die Membran kurz abgetropft und luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie überführt. Die restliche Entwicklerlösung wurde an den Seiten der Folie mit einem Papiertuch abgesaugt und die Membran in eine Entwicklerkassette gelegt. Sofort wurde die Lumineszenz im Bereich von 450 nm bis 500 nm im Chemilumineszenzsystem Chemi-Smart 5000 der Firma Peqlab sichtbar gemacht und die Aufnahmen zur Auswertung mittels der Chemi-Capt Software gespeichert. Zum Abschluss wurde die Membran für 30 min in STRIP-Lösung (siehe Tab. 2.18) geschwenkt und anschließend an der Luft getrocknet, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Somit ist eine erneute Detektion mit weiteren Antikörpern möglich.

Tabelle 2.18: Überblick der verwendeten primären und sekundären Antikörper für Ratte und Mensch in der entsprechenden Konzentration und eingesetzten Verdünnung, sowie zusätzlich verwendete Lösungen.

	Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Humane Zelllysate (HuH7)	Anti ASGPR1 (N-18) goat polyclonal IgG (Santa Cruz), 200 µg/ml, eingesetzt 1:500 verd. in 1% Magermilchpuffer	Donkey Anti goat IgG HRP (Santa Cruz), 200 µg/ml, eingesetzt 1:1000 verd. in 1% Magermilchpuffer
	Anti GAPDH (V-18) goat polyclonal IgG (Santa Cruz), 200 µg/ml, eingesetzt 1:500 verd. in 1% Magermilchpuffer	
Rattenzelllysate (MH7777A)	Anti ASGPR1 (T-20) goat polyclonal IgG (Santa Cruz), 200 µg/ml, eingesetzt 1:500 verd. in 1% Magermilchpuffer	Donkey Anti goat IgG HRP (Santa Cruz), 200 µg/ml, eingesetzt 1:1000 verd. in 1% Magermilchpuffer
	Anti GAPDH (V-18) goat polyclonal IgG (Santa Cruz), 200 µg/ml, eingesetzt 1:500 verd. in 1% Magermilchpuffer	
Lösungen		
Waschlösung 1x TBSTween	1 x TBS mit 0,02 % (v/v) Tween 20 (Roth)	
STRIP-Lösung	0,2 M Glycin, 0,2 M HCl pH 1.8	

2.3.3.6 Nachweis von Proteinen mit Hilfe des ELISA

Der in dieser Arbeit verwendete Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) stellt ein Beispiel für einen klassischen Sandwich-ELISA dar (siehe Abb. 2.15). Dieser wird

verwendet, wenn aus einem umfangreichen Proteingemisch nur ein bestimmtes Protein detektiert werden soll. Zu Beginn wurde der nicht-markierte Erstantikörper an den Boden der 96-well ELISA Platte gebunden. Danach wurde die Probe in Form von Zellüberständen zugegeben und das Protein mit dem passenden Epitop an den Erstantikörper gebunden, die restlichen Proteine wurden ausgewaschen. Anschließend wurde der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper zugegeben, welcher an einem anderen Epitop des bereits angelagerten Ziel-Proteins bindet. Zum Abschluss wurde das Substrat *o*-Phenylendiamin zugegeben, welches in Anwesenheit von Meerrettich-Peroxidase und H_2O_2 zu einem wasserlöslichen gelb-orangen Produkt oxidiert wird (siehe Abb. 2.16). Dieses ist bei 492 nm spektrometrisch messbar und erlaubt eine quantitative Messung des gebundenen Proteins.

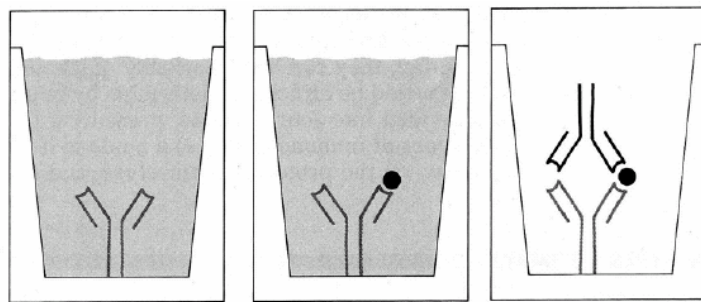


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung eines ELISA Experiments. Zuerst wird ein nicht-markierter Erstantikörper an die Assay-Platte gebunden. Anschließend wird die Probe zugegeben, von der nur Proteine mit dem richtigen Epitop an den Antikörper binden. Zum Abschluss wird ein mit HRP markierter Antikörper zugegeben und über eine enzymatische Farbreaktion das gebundene Proteine nachgewiesen.

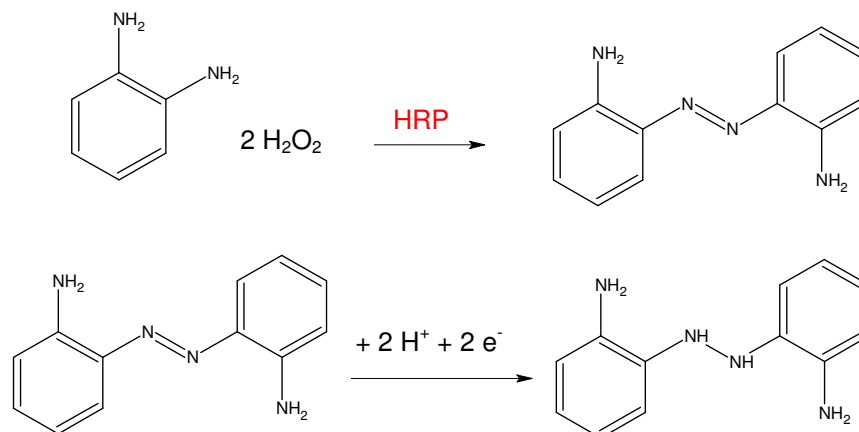


Abbildung 2.15: Chemische Darstellung der beim ELISA ablaufenden Enzymreaktion. Das Substrat o-Phenylendiamin wird durch Meerrettichperoxidase und Zugabe von H₂O₂ zu 2,2'-Diaminoazobenzen oxidiert.

Praktische Durchführung

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde der Erstantikörper (AB 742, human Anti-ApoB goat polyclonal, Chemicon) 1:1000 in PBS verdünnt und 100 µl/well ü.N. bei 4 °C an den Boden der Polystyren 96-well Platte (EIA/RIA, Costa High Binding Plate, Corning Incorporated) gebunden. Optional konnte dieser Prozess auch bei 37 °C für 2 h am Versuchstag durchgeführt werden. Anschließend wurden mit einer 1% (w/v) Rinderserumalbumin-Lösung (Roth) in PBS (300 µl/well) für eine Stunde bei Raumtemperatur die freien Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte blockiert. Durch den nachfolgenden Waschvorgang (3 x 200 µl/well PBS) wird überschüssiges BSA und nicht gebundener Antikörper entfernt. Danach wurden 50 µl/well Zellüberstand und 50 µl/well einer 0,5% igen BSA-Lösung in PBST (PBS und 0,1% Tween 20 von Roth) auf die Platten gegeben. Zusätzlich wurde eine ApoB Eichreihe (40, 20, 10, 5, 2,5 ng in 0,5% igen BSA-Lösung in PBST) pipettiert. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen (5 x 200 µl/well PBST und 3 x 200 µl/well PBS), um die nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Nachfolgend wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter Antikörper (20HG1b, human Anti ApoB goat polyclonal IgG-HRP, Academy Bio-Medical Co.) gegen das Zielprotein zugegeben (1:1000 in 0,5% igen BSA-Lösung in PBST, 100 µl/well). Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h und 30 min. Danach wurde erneut mit PBST und PBS gewaschen und 100 µl/well des chromogenen Substrats (1 Tablette o-Phenylendiamin von Calbiochem in 11 ml 50 mM Citratpuffer pH 4.0 und

11 μl H_2O_2 von Calbiochem) zugegeben. Diese Lösung ist maximal 30 min stabil. Innerhalb dieser Zeit trat durch die ablaufende Enzymreaktion eine Gelbfärbung auf, welche durch die Absorption bei 490 nm mit einem Plattenphotometer (Multilabelcounter Victor 1420) der Firma Perkin Elmer gemessen wurde. Vor der Messung musste jedoch das Enzym mit 50 μl /well einer 2,5 N H_2SO_4 inaktiviert werden, da ansonsten durch eventuelle Verzögerungen das Ergebnis verfälscht werden würde (Soutschek et al., 2004a).

3 Ergebnisse

Zur Entwicklung eines Therapeutikums auf RNAi-Basis, mußte zunächst ein Weg gefunden werden, die siRNA ins Zytoplasma der Zellen einzubringen. Die negative Ladung des Zucker-Phosphatrückgrats und das hohe Molekulargewicht von Nukleinsäuren verhindern allerdings eine passive Permeation der Zellmembran. Durch die Anknüpfung kleiner Moleküle an den 5'-Terminus des Sense Strangs der siRNA sollte eine Aufnahme dieser Konjugate in das Zytoplasma erreicht werden (siehe Abschnitt 1.5 Zielsetzung). Durch kurze organisch chemische Synthesesequenzen sollten einige der ausgewählten Verbindungen in das entsprechende Phosphoramidit überführt werden. Dies ermöglichte eine Konjugation dieser Verbindungen während der RNA-Festphasensynthese an das 5'-Ende des Sense Stranges. Eine weitere Möglichkeit zur Anknüpfung kleiner Moleküle war die postsynthetische Kopplung. Hierzu wurde während der RNA-Synthese ein *N*-Hydroxysuccinimid-Aktivester an die RNA gekoppelt und anschließend an der festen Phase eine Amidbindung mit den eingesetzten Verbindungen geknüpft.

Doch nicht nur die Aufnahme ins Zytoplasma, sondern auch die Aktivität der synthetisierten siRNAs stand im Fokus dieser Arbeit. So wurden die modifizierten siRNAs in Zellkulturexperimenten mit und ohne Transfektionsreagenz hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, eine posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression zu bewirken.

3.1 Organisch-chemische Synthese

Die Einführung chemischer Modifikationen am 5'-Terminus des Sense Stranges einer siRNA wird toleriert, ohne die Aktivität der siRNA zu beeinflussen (Czauderna et al., 2003, Braash et al., 2003, Harbourth et al., 2003, Lorenz et al., 2004). Da die synthetisierten Verbindungen am 5'-Ende des Sense Stranges eingeführt werden sollten, bot sich eine Kopplung direkt im Anschluss an die RNA-Festphasensynthese am Synthesizer an. Dazu mussten die herzustellenden Verbindungen entsprechend modifiziert werden. Analog zu den Standard-Nukleotiden für die Festphasensynthese wurde eine Phosphoramidit-Gruppe eingebracht (siehe Kapitel 2.2.1). Diese wurde für jede Verbindung in der letzten Synthesestufe, der sogenannten Phosphitylierung, an einer freien Hydroxyl-Funktion eingeführt.

3.1.1 Synthese des Steroid-Derivats Litho (3)

Lithocholsäure **1** wurde mit Di-n-decylamin umgesetzt, um das entsprechende Amid **2** zu synthetisieren (siehe Abb. 3.1). Als Aktivator für die Carboxylgruppe der Lithocholsäure diente 1 Äquivalent (Äq.) EDCI (Lorenz et al., 2004). Dieses wasserlösliche Carbodiimid ermöglicht einen Angriff der Aminogruppe des Di-n-decylamins an die Carboxylfunktion der Säure. Zusätzlich wurde 1 Äq. DMAP zugefügt und als Lösungsmittel ein Gemisch aus DMF und DCM gewählt, (siehe Abschnitt 3.3.2.1). Das Lithocholsäure-di-n-decylamid konnte nach Chromatographie mit einer Ausbeute von 47,7% als gelber Feststoff erhalten werden.

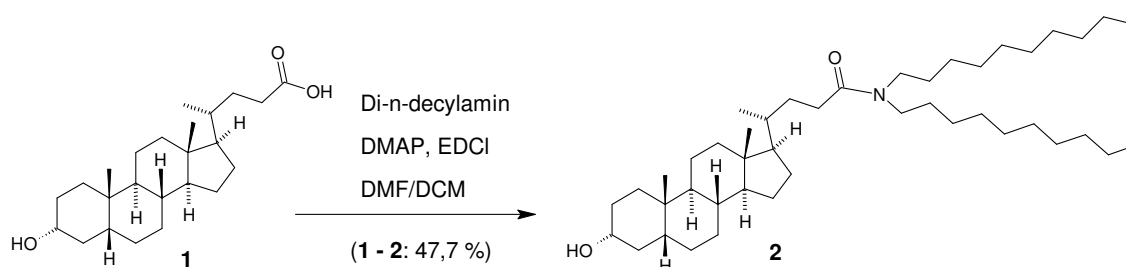


Abbildung 3.1 Überführung von Lithocholsäure **1** ins Säureamid **2**.

Die freie Hydroxyl-Gruppe an Position 3 des Säureamids **2** wurde anschließend zum Phosphoramidit umgesetzt, wie in Abbildung 3.2 gezeigt. Dazu wurden 3 Äq. DIPEA und 1 Äq. 2-Cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidit eingesetzt (MacKellar et al., 1992d). Die Reaktion wurde in wasserfreiem DCM unter Argon durchgeführt. Auf Grund der Säure- und Hydrolyseempfindlichkeit von Phosphoramiditen wurde bei der Dünnschicht- und Säulenchromatographie dem Laufmittel jeweils 1% Triethylamin zugesetzt und das Produkt unter Argonschutzgas bei -20 °C gelagert.

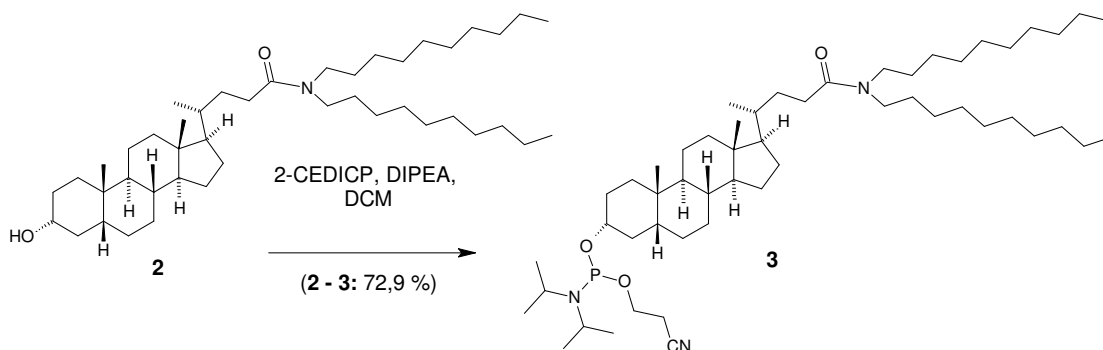


Abbildung 3.2: Phosphitylierung von Lithocholsäure-di-n-decylamid **2**.

3.1.2 Synthese des Cholesterin-Derivats Chol (**6**)

Zunächst wurde Cholesteryl-chloroformiat **4** durch Umsatz mit 1,2 Äq. 6-Aminohexanol, in Anwesenheit von 1,5 Äq. NaHCO_3 , in das entsprechende Säureamid **5** überführt. Sowohl durch die gewählte Reaktionstemperatur von 0°C und das langsame Zutropfen von 6-Aminohexanol als auch die höhere Nukleophilie des Stickstoffs konnte die chemoselektive Bildung des Amids gegenüber dem Ester begünstigt werden (Romo et al., 1998). Das Säureamid **5** konnte in einer Ausbeute von 82,4% als weißer, kristalliner Feststoff nach chromatographischer Reinigung erhalten werden. Dieser wurde anschließend unter Argongegenstrom und Zusatz von 1,2 Äq. DIPEA, 1,5 Äq. 2-CETIP und 1,1 Äq. 0,5 M ETT als Aktivator an der freien Hydroxyl-Gruppe phosphityliert (MacKellar et al., 1992c) und Verbindung **6** nach Säulenchromatographie mit einer Ausbeute von 58,5% gewonnen (siehe Abb.3.3).

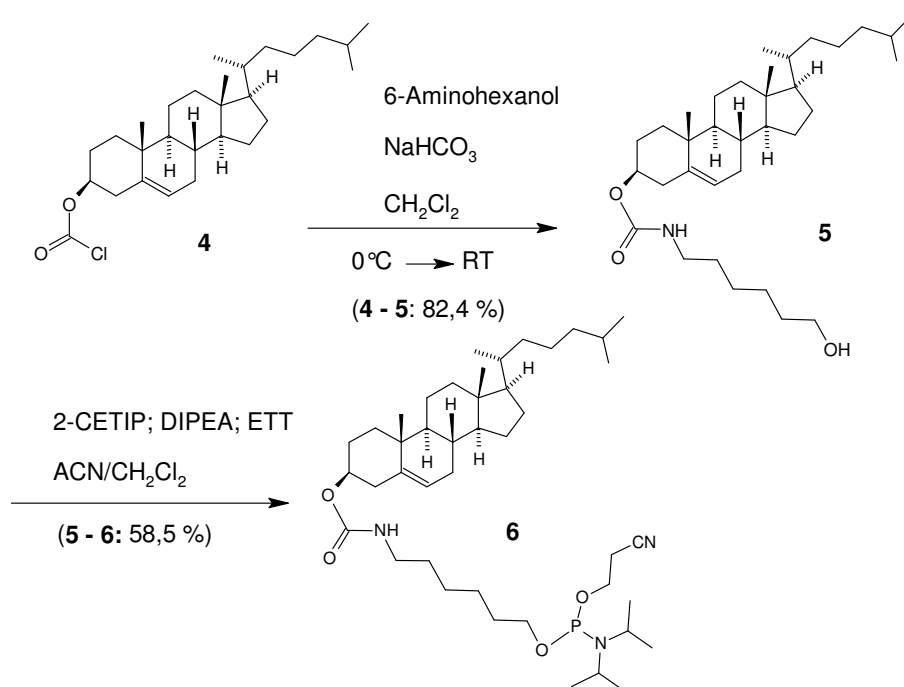


Abbildung 3.3: Zweistufensynthese von Chol 6.

3.1.3 Synthese des Lupan-Derivats Betulin (9)

Das pflanzliche Triterpen Betulin **7** besitzt interessante pharmakologische Eigenschaften (Singh et al., 2002) und zudem an Position 3 eine sekundäre und an Position 28 eine primäre freie Hydroxyl-Funktion. Auf Grund der unterschiedlichen Reaktivität beider Gruppen und des sterischen Bedarfs der Trityl-Gruppe konnte durch Zugabe von 1,5 Äq. DMT-Cl die primäre Hydroxyl-Gruppe trityliert werden, um Verbindung **8** mit 64,2% Ausbeute zu erhalten (MacKellar et al., 1992b). Anschließend wurde die sekundäre Hydroxyl-Funktion analog zu Verbindung **6** mit einer Phosphoramiditgruppe versehen. Hierzu wurden 1,5 Äq. 2-Cyanoethyletraisopropylphosphan, 1,2 Äq. DIPEA und 1,1 Äq. ETT eingesetzt. Das resultierende Produkt **9** (siehe Abb. 3.4) konnte nach Reinigung in 33,5%iger Ausbeute gewonnen und über die Amidit-Funktion an die RNA gekoppelt werden.

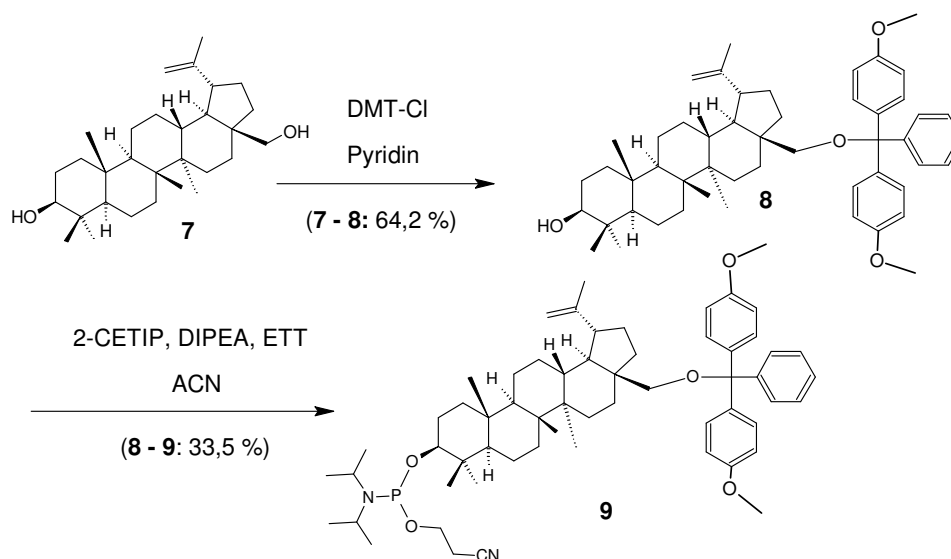


Abbildung 3.4: Umsetzung von Verbindung **7** zum Tritylether **8** und anschließende Phosphitylierung zu Produkt **9**.

3.1.4 Synthese des Steroid-Derivats 3BChol (**11**)

Im Fall von 3- β -Cholestanol **10** wurde direkt an Position 3 des Ringsystems die Phosphitylierung der freien Hydroxyl-Funktion durch Umsetzung mit 1,5 Äq. 2-CETIP, 1,2 Äq. DIPEA und einem 1,1 molaren Überschuss an Aktivator durchgeführt. Die Reaktion lieferte Produkt **11** mit einer Ausbeute von nur 20% nach chromatographischer Reinigung.

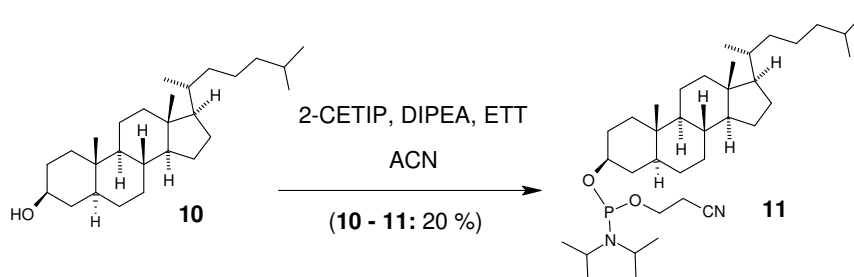


Abbildung 3.5: Umsetzung von 3-Beta-Cholestanol **10** zum Phosphoramidit **11**.

3.1.5 Synthese des Galaktose-Derivats GAL (**18**)

Die Synthese des Galaktosylamidits **18** wurde über drei verschiedene Strategien verfolgt.

Möglichkeit **A** lieferte zunächst nach Reaktion des Glykosyldonors (Edukt **12**) mit 1,5 Äq. 4-*cis*-Benzyloxy-2-buten-1-ol (Glykosylakzeptor) unter Lewis-Säurekatalyse mit

BF₃-Etherat das entsprechende Galaktopyranosid **13** in 68,2% Ausbeute. Das vollständig deacetylierte Produkt **14** konnte nach basischer Esterspaltung in einer Ausbeute von 77,2% gewonnen werden. Nach Einführung der MMT-Gruppe in **14** mit 1,5 Äq. MMT-Cl in Pyridin und anschließender Peracetylierung von **15** mittels Acetanhydrid wurde die Benzylschutzgruppe durch katalytische Hydrogenolyse über Palladiumhydroxid auf Aktivkohle entfernt und gleichzeitig die Doppelbindung hydriert. Der dabei entstandene Alkohol **17** wurde mit einer Ausbeute von 70,4% erhalten. Zum Abschluss konnte die primäre Hydroxyl-Funktion des β -Glykosids mit 1,5 Äq. 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphan mit einer Ausbeute von 82,8% zu Verbindung **18** phosphityliert werden (siehe Abb. 3.5 und 3.6).

Bei Möglichkeit **B** wurde der gleiche Syntheseweg eingeschlagen, anstelle von 4-*cis*-Benzyloxy-2-buten-1-ol als Aglykon wurde hier mit 4-Benzyloxy-1-butanol gearbeitet, um das entsprechende Pyranosid **13a** zu synthetisieren. Die anschließende Deacetylierung lieferte Produkt **14a** mit einer Ausbeute von 88,6%. Im Anschluss an die Tritylierung **15a**, Peracetylierung **16a** und Hydrogenolyse konnte der freie Alkohol **17** mit 46,5% Ausbeute erhalten werden. Die Phosphitylierung führte zu Verbindung **18**, welche mit einer Ausbeute von 66% gewonnen wurde (siehe Abb. 3.5 und 3.6).

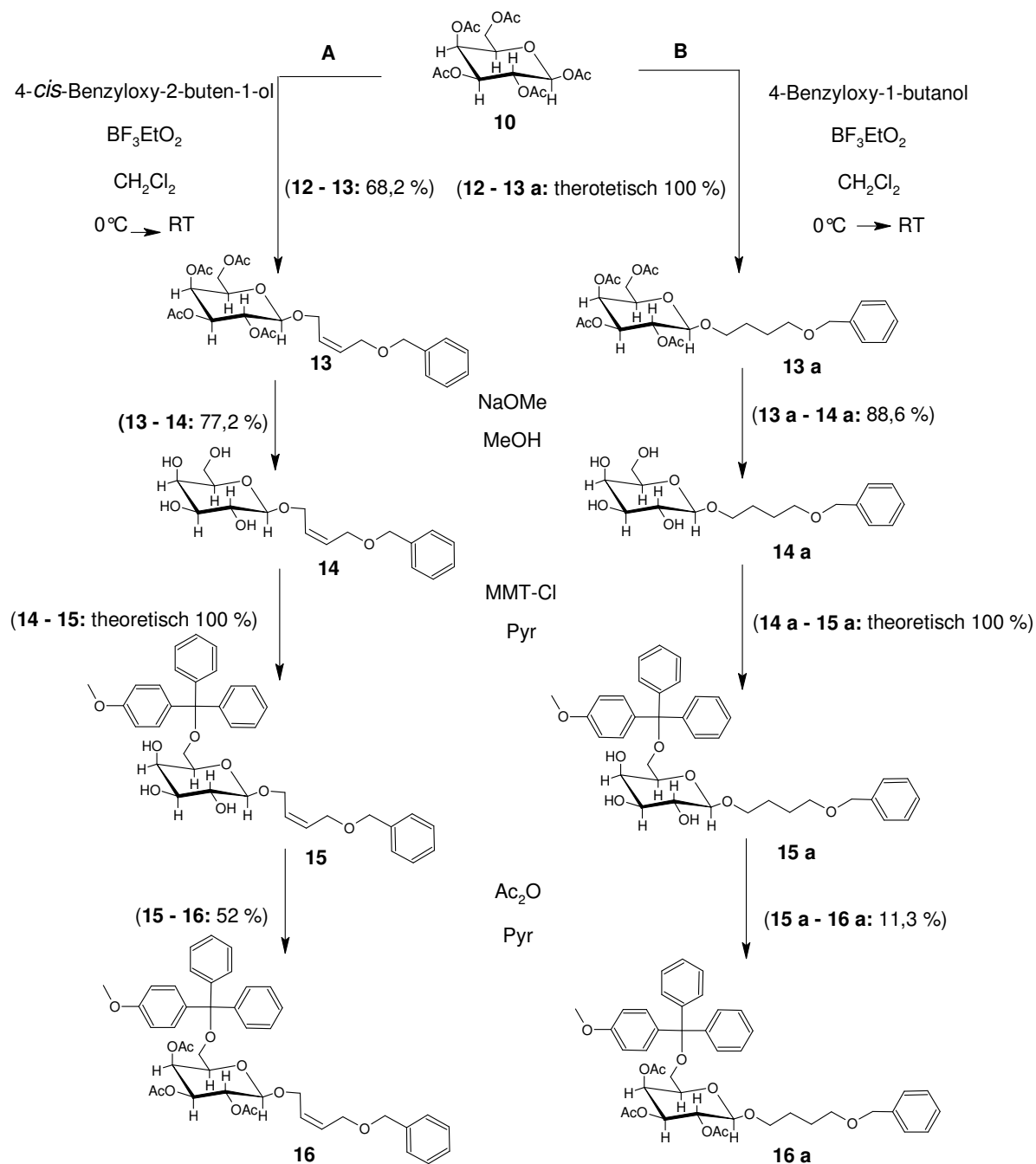


Abbildung 3.6: Synthesestrategien A und B zur Herstellung von tritylierten Galaktopyranosiden **16** und **16a**.

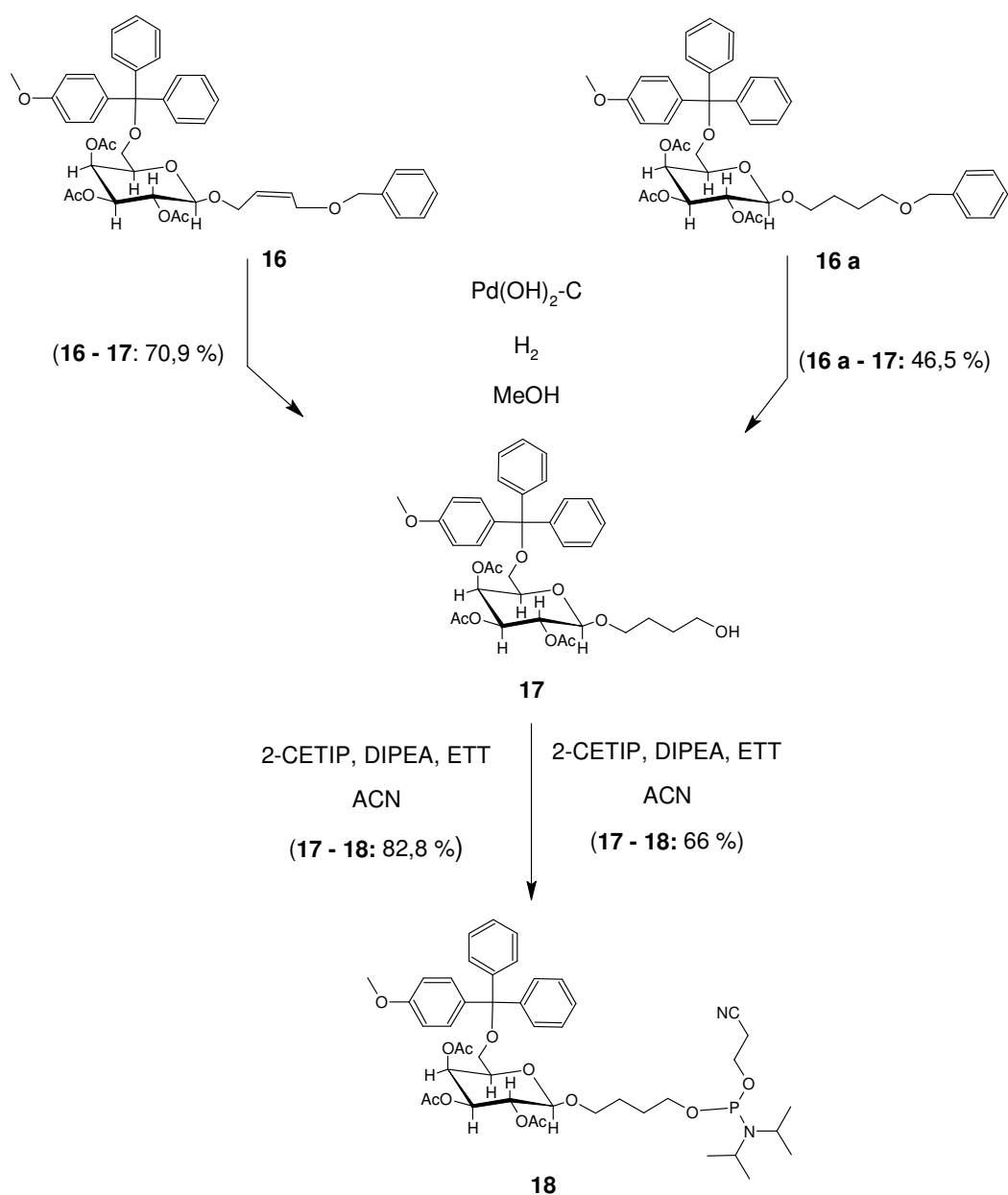


Abbildung 3.7: Umsetzung von tritylierten Galaktopyranosiden (**16** und **16a**) durch katalytische Hydrogenolyse **17** und Phosphitylierung zum Galaktosylamidit **18**.

In Möglichkeit **C** (Abb. 3.8) wurde eine andere Synthesestrategie verfolgt. Zu Beginn wurde die Hydroxyl-Funktion am anomeren Zentrum des Edukts **12** durch Zusatz von 1,2 Äq. Benzylamin deacetyliert und somit *D*-Galaktosetetraacetat **19** erhalten. Im Anschluss wurde die *O*-Glykosidierung nach der Trichloracetimidat-Methode von R.R. Schmidt durchgeführt (Schmidt und Kinzy, 1994), indem durch Umsatz mit 0,4 Äq. DBU und einem 4 molaren Überschuss an Trichloracetonitril das entsprechende *O*-Galaktosyl-trichloracetimidat **20** mit 71,5% Ausbeute synthetisiert wurde. Unter Säurekatalyse und Zusatz des entsprechenden Aglykons sollte das gewünschte β -

Glykosid erhalten werden (Rio et al., 1993). Vorangegangene Testreaktionen zeigten, dass bei der Umwandlung in das TBS-geschützte Pyranosid **21** zahlreiche Nebenprodukte entstanden, welche nicht näher charakterisiert wurden. Um eine möglichst hohe Syntheseausbeute zu erhalten, wurde bei einer Temperatur von -78 °C und einem 1,5 molaren Überschuss TBS-Butanol sowie 0,25 Äq. Silbertriflat gearbeitet (Yang et al., 2000b). So konnte das entstandene Produkt **21** mit einer Ausbeute von 78% isoliert werden. Die anschließende Deacetylierung führte zu Verbindung **22** und wurde sodann mit einem 1,5 molaren Überschuss an MMT-Cl trityliert, um Verbindung **23** herzustellen. Diese wurde direkt mit 4 Äq. Acetanhydrid pro freier Hydroxyl-Gruppe in Pyridin acetyliert. Hier konnten allerdings keine sauberen Produktfraktionen der peracetylierten Verbindung **24** mit Hilfe der Säulenchromatographie isoliert werden. Daher wurde das Produkt in zwei Ansätze geteilt und durch Zusatz von 1,5 Äq. TBAF die TBS-Schutzgruppe entfernt. Die Entschützung lieferte Verbindung **17** mit Ausbeuten von 52% und 70,7%. Im letzten Syntheseschritt wurde die Phosphitylierung der freien Hydroxylfunktion durch Reaktion mit 1,5 Äq. 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphan durchgeführt und das Galaktosylamidit **18** mit 74,3% Ausbeute erhalten. In Abbildung 3.8 ist die durchgeführte Synthesestrategie schematisch dargestellt.

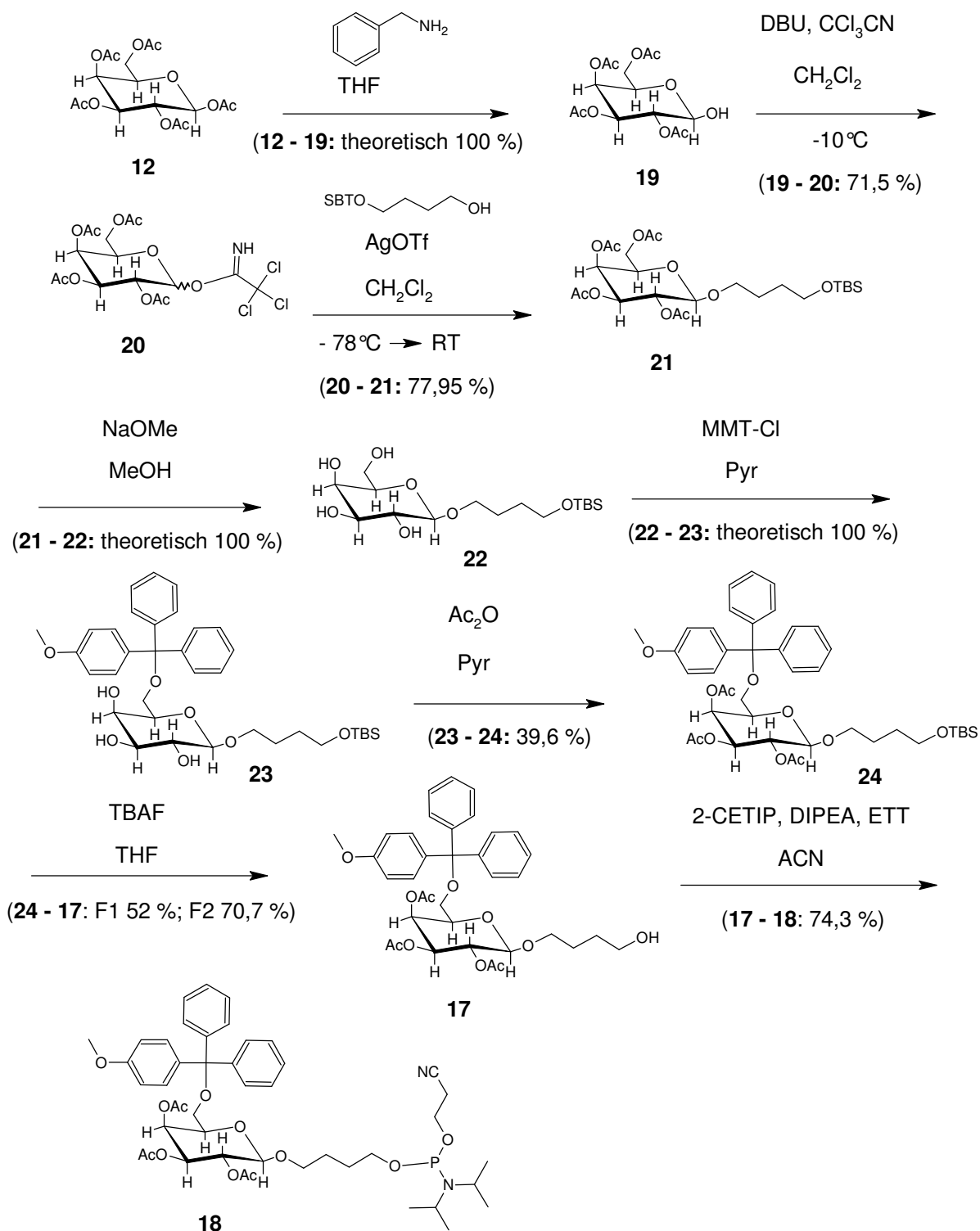


Abbildung 3.8: Möglichkeit C zur Darstellung des tritylierten Galaktoseamidits **18**.

3.1.6 Synthese eines *N*-Acetyl-galaktosamin-Derivats **26**

Für die Synthese eines phosphitylierten *N*-Acetyl-galaktosamins wurde die Synthesever variante **A** (Abschnitt 3.1.4) gewählt. Die Umsetzung von *N*-Acetyl-

galaktosamin **25** mit einem 1,5 molaren Überschuss 4-*cis*-Benzyloxy-2-buten-1-ol unter Zusatz von BF₃-Etherat führte jedoch nicht zum gewünschten Pyranosid **26**. Nach 24 h Reaktionszeit konnte kein Produkt detektiert werden (siehe Abb. 3.9).

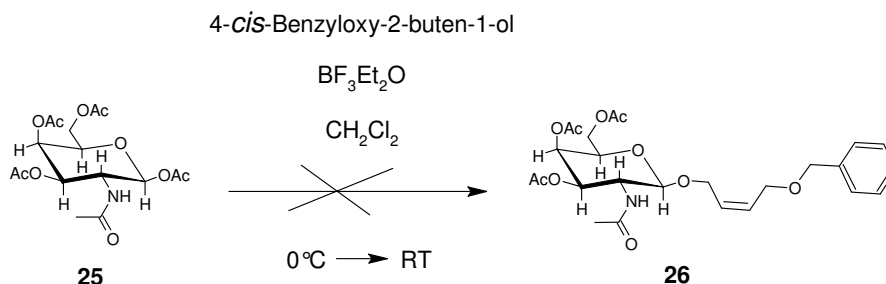


Abbildung 3.9: Umsetzung von *N*-Acetyl-galaktosamin **25** mit 4-*cis*-Benzyloxy-2-buten-1-ol.

3.2 RNA-Synthese

In der vorliegenden Arbeit sollten verschieden modifizierte siRNAs, welche sich gegen die *apoB* m-RNA richteten, hinsichtlich ihrer Zellaufnahme und ihres RNA-Interferenzeffekts untersucht werden. Dies setzt voraus, dass die verwendete siRNA-Grundsequenz ohne 5'-Sense Modifikation bei Transfektion einen messbaren Interferenzeffekt zeigt. Der gewünschte Effekt beinhaltet eine deutliche Reduktion von ApoB, sowohl auf m-RNA- als auch auf Protein-Ebene. Daher wurde eine *apoB* Grundsequenz gewählt, welche in unterschiedlichen *in vitro* Experimenten der Alnylam Europe AG als die Potenteste identifiziert wurde (ORF Position 10049 – 10071) (Soutschek et al., 2004j). Der Sense Strang setzt sich aus 21 Nukleotiden zusammen und der Antisense Strang besteht aus 23 Nukleotiden, so dass sich ein 2 Nukleotid-Überhang am 3'-Ende des Antisense Stranges ergibt (siehe dazu Kapitel 2.2). Diese *apoB* Grundsequenz wurde für alle 5'-Sense Modifikationen eingesetzt und mit den kommerziell erhältlichen 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)-Phosphoramiditen von Uridin, 4-*N-tert*-Butylphenoxyacetylcytidin, 6-*N-tert*-Butylphenoxyacetyladenin und 2-*N-tert*-Butylphenoxyacetylguanosin Monomeren nach einem Standard-Protokoll für die RNA-Festphasensynthese hergestellt (Damha und Ogilvie, 1993). RNA-Stränge mit einem Phosphorothioat-Rückgrat, zur Erhöhung der Nukleaseresistenz, wurden durch Oxidation des Phosphits mit Beaucage Reagenz oder mittels EDITH eingeführt, siehe Kapitel 2.2 (Xu et al., 1996a). Für die Einführung von 2'-O-Methylmodifikationen (Abb. 1.9) an der Ribose wurden entsprechend modifizierte,

kommerziell erhältliche Nukleotide verwendet. Des Weiteren wurden in den *in vitro* Experimenten modifizierte siRNAs als Negativkontrollen verwendet. Diese waren gegen die *bcl2* m-RNA, als endogen exprimiertes Zielgen, oder gegen *gfp* gerichtet, welches nicht in den Zielzellen exprimiert wird. Die Synthese dieser siRNAs erfolgte ebenfalls nach dem Standard-Protokoll (Damha und Ogilvie, 1993).

Die synthetisierten Amidite **3**, **6**, **9**, **11** und **18** konnten analog zu den kommerziellen Standard-Amiditen in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Abbildung 3.10 gibt einen Überblick der hergestellten Amiditverbindungen.

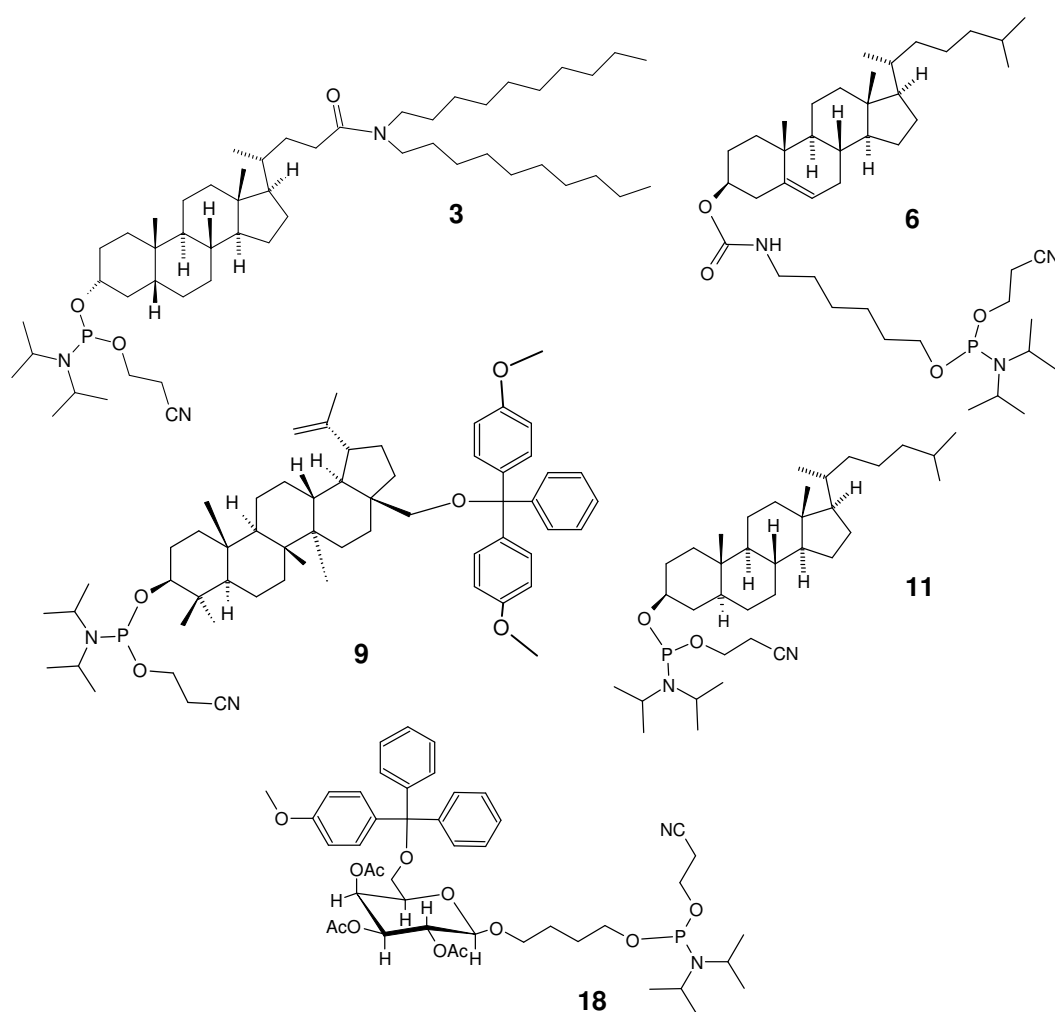
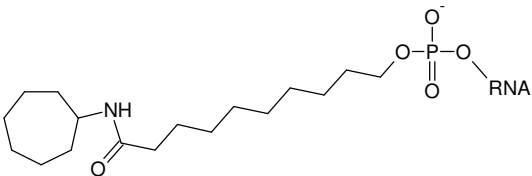
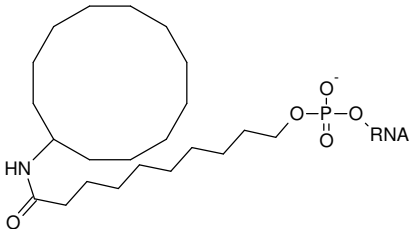
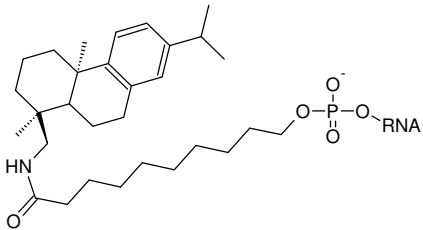
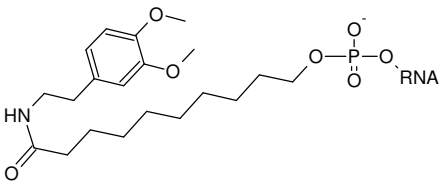


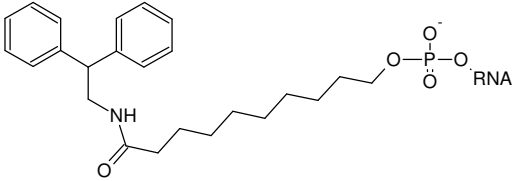
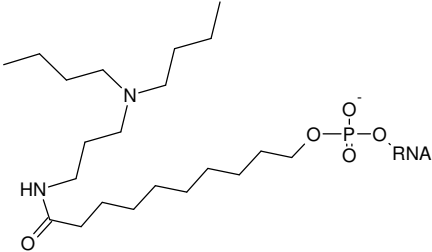
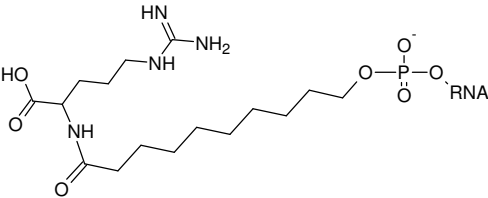
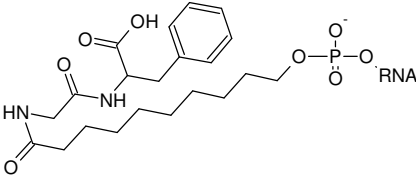
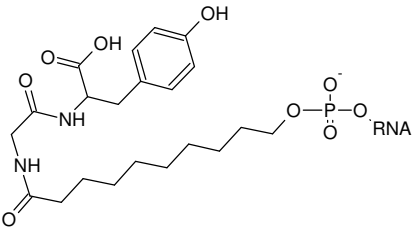
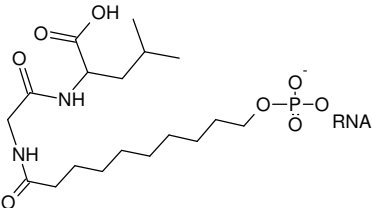
Abbildung 3.10: Gezeigt sind die Strukturformeln der hergestellten Amidite, welche in der RNA-Festphasensynthese an das 5'-Ende des Sense Stranges gekoppelt wurden. **3** Litho-Amidit, **6** Chol-Amidit, **9** Bet-Amidit, **11** 3BChol-Amidit und **18** Gal-Amidit.

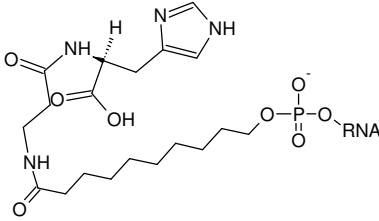
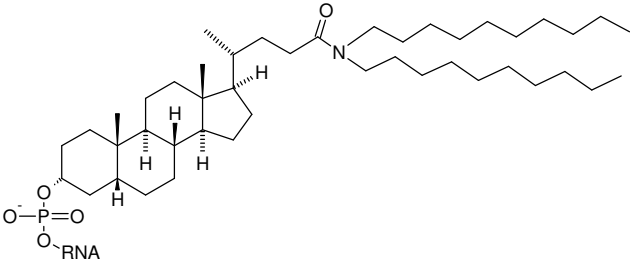
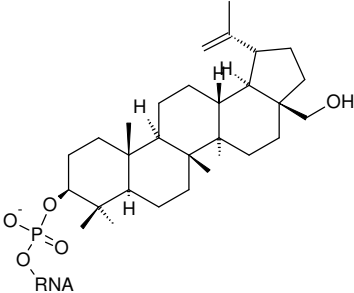
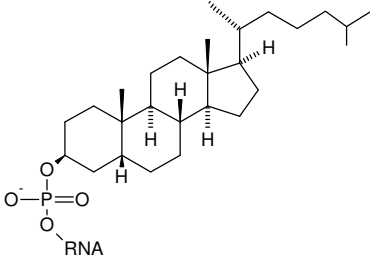
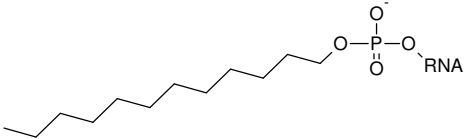
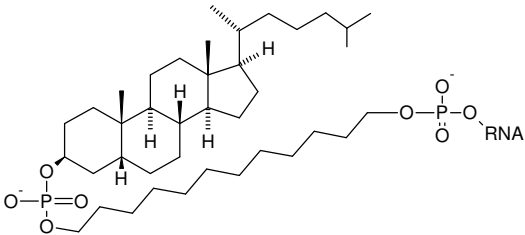
Durch den Einsatz spezieller Linker-Amidite (SB, TEG und C12, siehe Kapitel 2.2.1) und anschließender Kopplung der synthetisierten Amidite konnte das Spektrum der Modifikationen erweitert werden (hierzu siehe Kapitel 2.2.10 und Tabelle 3.1).

Die Kopplung von Aminen, Aminosäuren und Dipeptiden erfolgte erst im Anschluss an die Festphasensynthese. Hierzu wurde die synthetisierte RNA jedoch auf dem Trägermaterial belassen und die zu konjugierenden Substanzen mit Hilfe der „Spritzenmethode“ postsynthetisch gekoppelt (siehe Kapitel 2.2.3). Durch eine aktivierte N-Hydroxysuccinimid-Säuregruppe (NHS-Ester) an der RNA und Zusatz des entsprechenden Amins wurde so eine Amidbindung geknüpft, die während der Abspaltung von der Festphase und der einhergehenden Basen- und Phosphatentschützung stabil blieb (siehe Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht der Modifikationen am 5'-Terminus des Sense Stranges mit der verwendeten Abkürzung und der Strukturformel unter Einbeziehung der Konjugation an die RNA.

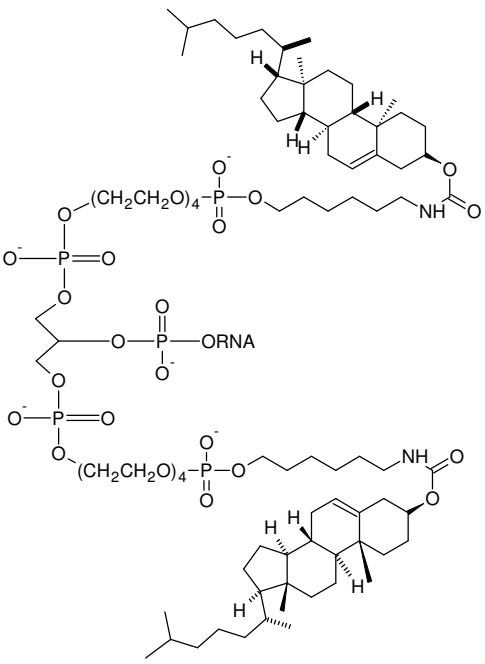
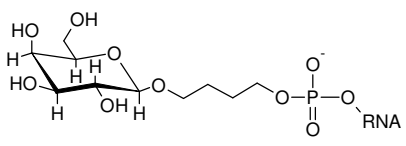
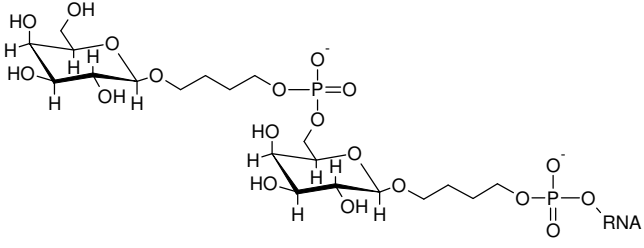
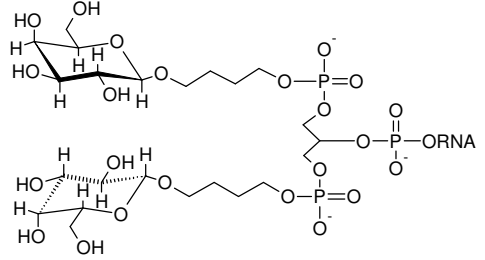
Abkürzung	Strukturformel
Cyclohep	
Cyclodod	
Deh	
Dimethoxy	

Abkürzung	Strukturformel
Diphenyl	
Dibutyl	
Arg	
GlyPhe	
GlyTyr	
GlyLeu	

Abkürzung	Strukturformel
Carn	
Litho	
Bet	
3BChol	
C12	
C123BChol	

Abkürzung	Strukturformel
SB3BChol	
SB1xChol	
SBTEG	

Abkürzung	Strukturformel
SBTEG 3BChol	
SBTEG 1xChol	

Abkürzung	Strukturformel
SBTEG 2xChol	
1xGAL	
2xGAL	
SBGAL	

Abkürzung	Strukturformel
SBTEGGAL	

Nach Abspaltung vom Trägermaterial, Basenentschützung und 2'-Desilylierung wurden die Rohprodukte mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert und anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt.

3.2.1 Reinigung und Charakterisierung von Einzelstrang-RNA

Je nach Art der eingeführten 5'-Modifikation wurden verschiedene Reinigungsmethoden mittels HPLC evaluiert.

Die Amin-, Aminosäuren- und Dipeptid-gekoppelten RNA-Einzelstränge wurden über eine Phasenumkehr-Methode (RP-Reversed Phase) mit einem Lösungsmittelgemisch aus 100 mM TEAA und 100 mM TEAA mit 90% ACN über einer XTerra Säule gereinigt (siehe Kapitel 2.2.6). Beispielhaft ist die präparative Reinigung und anschließende Charakterisierung über LC-MS des GlyTyr-Konjugats gezeigt (Abb.3.11, 3.12 und 3.13).

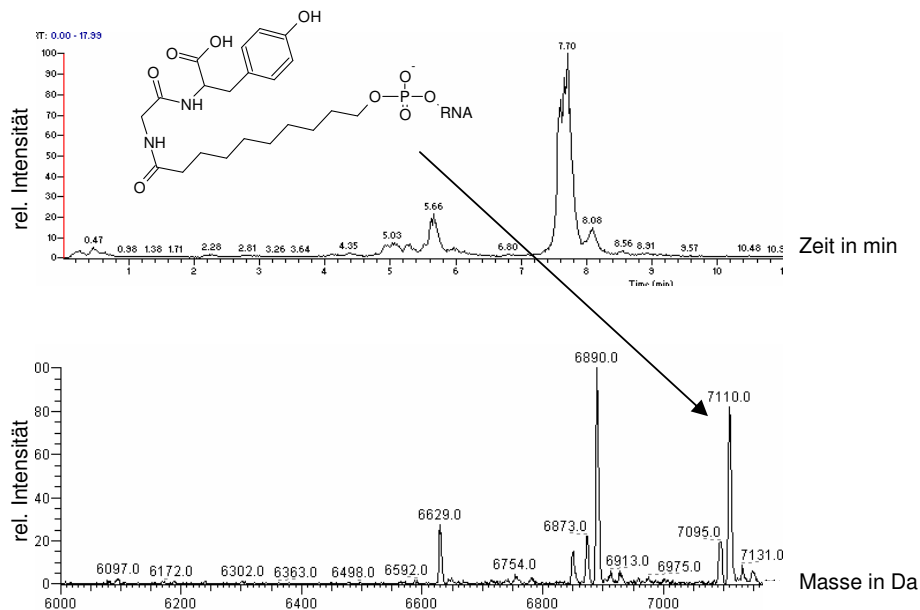


Abbildung 3.11: LC-Analyse und ESI-MS Spektrum des GlyTyr Rohprodukts.

Der Hauptpeak im LC-Chromatogramm des Rohprodukts eluierte bei 7,70 min und konnte anhand der theoretisch bestimmten Masse von 7112 Da als das gewünschte Konjugat durch das ESI-MS Spektrum identifiziert werden.

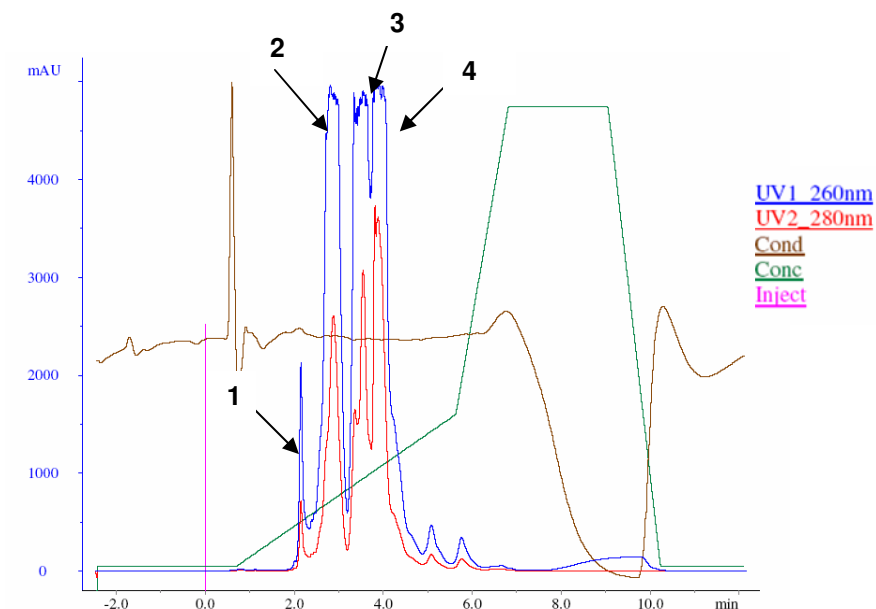


Abbildung 3.12: Chromatogramm der präparativen Reinigung des GlyTyr-Konjugats über Phasenumkehr-Chromatographie. Gezeigt ist die Absorption bei 260 nm (blau) und 280 nm (rot) sowie der programmierte Gradient (grün), die Leitfähigkeit (braun) und der Injektionspeak (rosa).

Im gezeigten Chromatogramm (Abb. 3.12) sind drei Hauptpeaks (2–4) und ein kleiner Nebenpeak (1) zu erkennen, welcher die Fehlersequenzen der RNA-Synthese

repräsentiert. Nach Fraktionierung und massenspektrometrischer Analyse konnte Peak 2 als das Volllängenprodukt des unkonjugierten RNA-Einzelstrangs identifiziert werden, Peak 3 enthält den Carbonsäure-gekoppelten Einzelstrang nach Abspaltung der NHS-Aktivester-Gruppe und Peak 4 stellte sich als das gewünschte konjugierte Produkt heraus (siehe auch Abb. 3.12, 3.13 und 3.14).

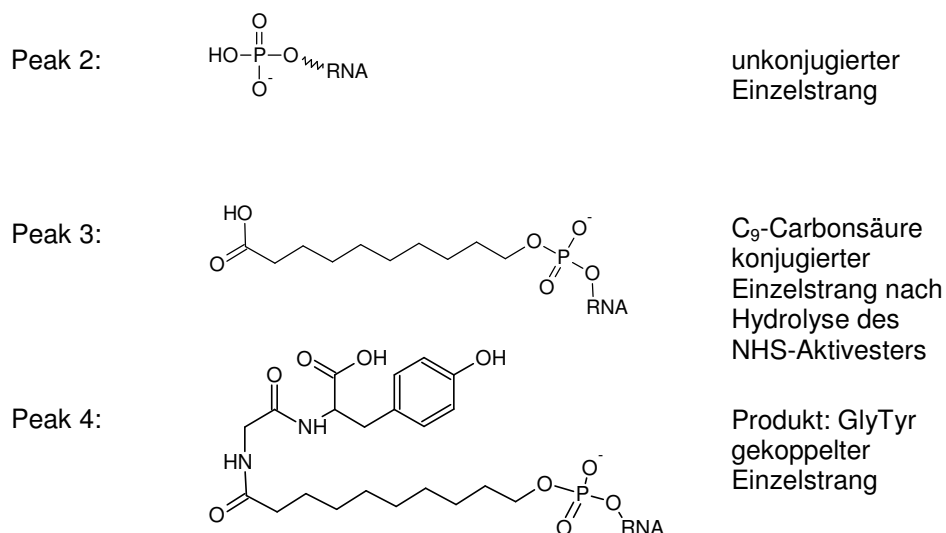


Abbildung 3.13: Auflistung der nach präparativer Phasenumkehrchromatographie isolierten Produkte.

Allgemein ist anzumerken, dass bei allen Konjugaten dieser Gruppe das gleiche Elutionsprofil beobachtet werden konnte, was eine Identifizierung des gewünschten Produkts erleichterte.

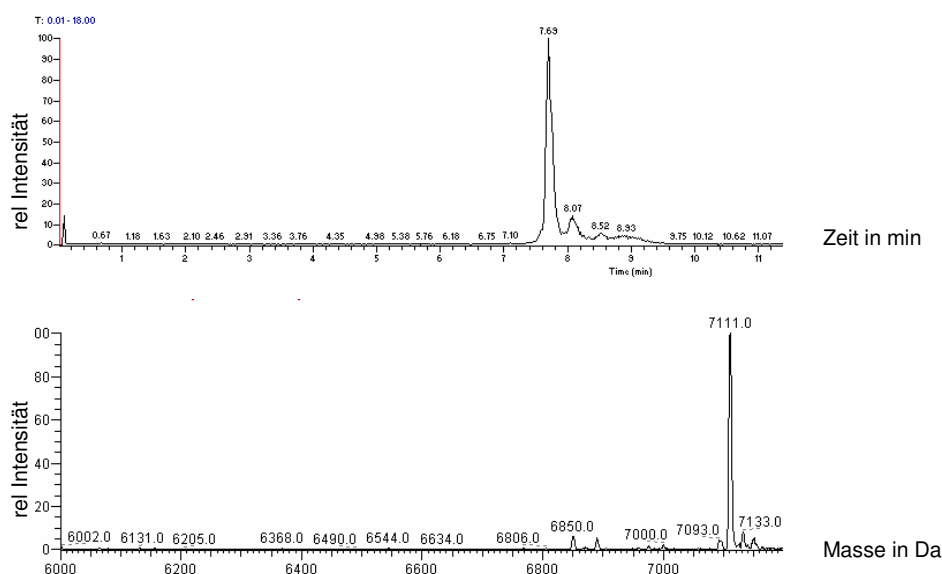


Abbildung 3.14: LC-Analyse und ESI-MS Spektrum des über HPLC gereinigten Produkts von GlyTyr.

Bei der Reinigung und Charakterisierung des Dehydroabietylamid-Konjugats (Deh) wurde nicht nur das gewünschte, sondern auch ein um 4 Da größeres Produkt identifiziert (Abb. 3.15).

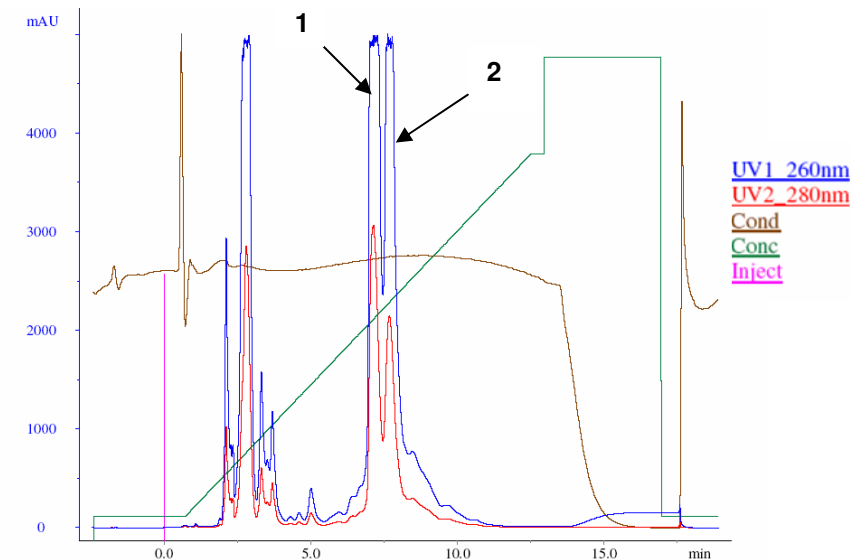


Abbildung 3.15: Chromatogramm der präparativen Reinigung des Deh-Konjugats.

Bei Reinigung über Phasenumkehrchromatographie spaltete sich der Produktpeak des Deh-Konjugats nochmals in zwei Peaks auf (Abb. 3.15).

Anhand der LC-Analyse (Abb. 3.16) ließen sich zwei Peaks bei 2,47 min und 7,49 min nachweisen. Das ESI-MS Spektrum zeigte das gesuchte Produkt mit einer Masse von 7158 Da und das Nebenprodukt mit 7161 Da, welches wahrscheinlich auf eine Verunreinigung im Ausgangsmaterial des Dehydroabietylamins zurückzuführen ist (siehe Abb. 3.16).

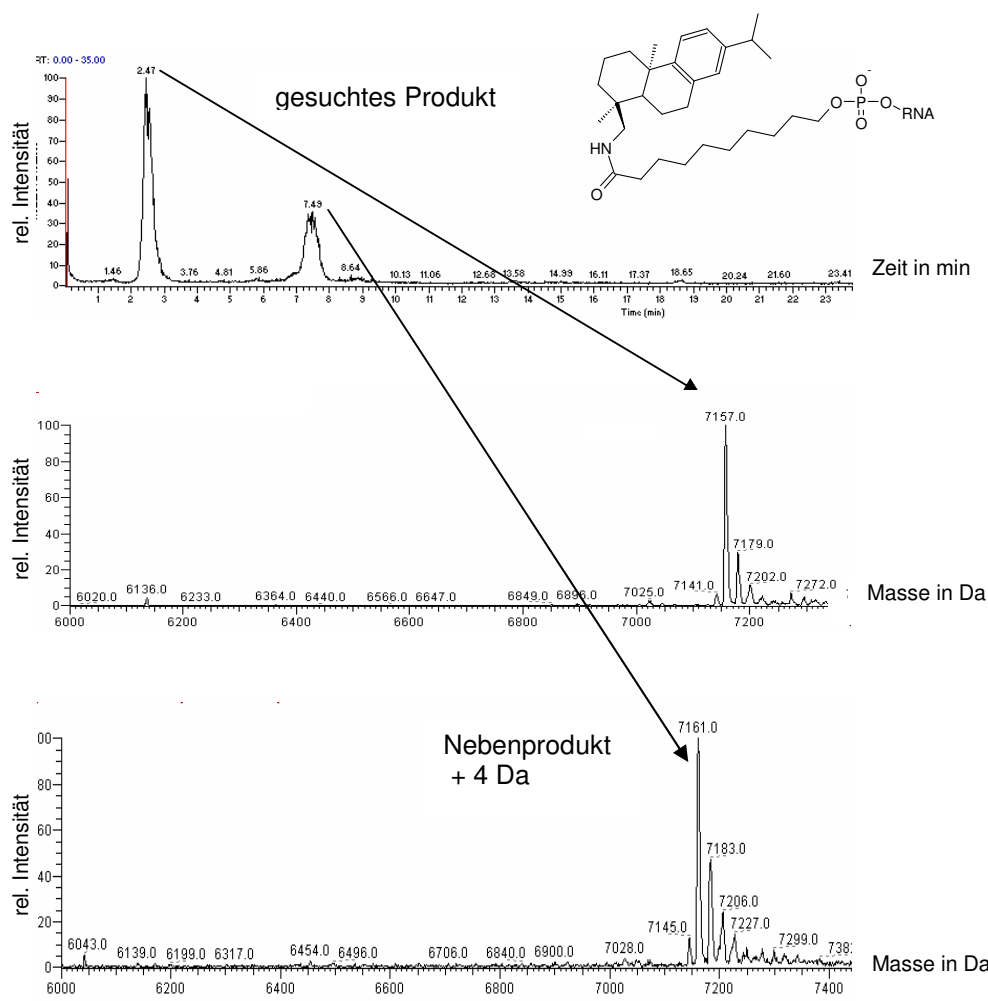


Abbildung 3.16: LC-Analyse des Rohprodukts und ESI-MS Spektren der gereinigten Deh-Konjugate.

Die RNA-Einzelstränge, welche mit hydrophoben steroid-ähnlichen Gruppen versehen wurden, konnten ebenfalls über Phasenumkehrchromatographie gereinigt werden. Dazu wurde ein Lösungsmittelgemisch aus 5 mM Na_2HPO_4 , 5 mM NaH_2PO_4 pH 6.86 und 5 mM Na_2HPO_4 , 5 mM NaH_2PO_4 pH 6.86, 65% ACN verwendet und über eine selbstgepackte Kronlab Säule (Polystyrol, 15 μm) gereinigt. Als Vertreter dieser Gruppe wird das C12-3-Beta-Cholestanol-Konjugat im folgenden Abschnitt näher erläutert. Abbildung 3.17 zeigt das entsprechende Chromatogramm der präparativen Reinigung und in Abbildung 3.18 ist die LC-MS Analyse dargestellt.

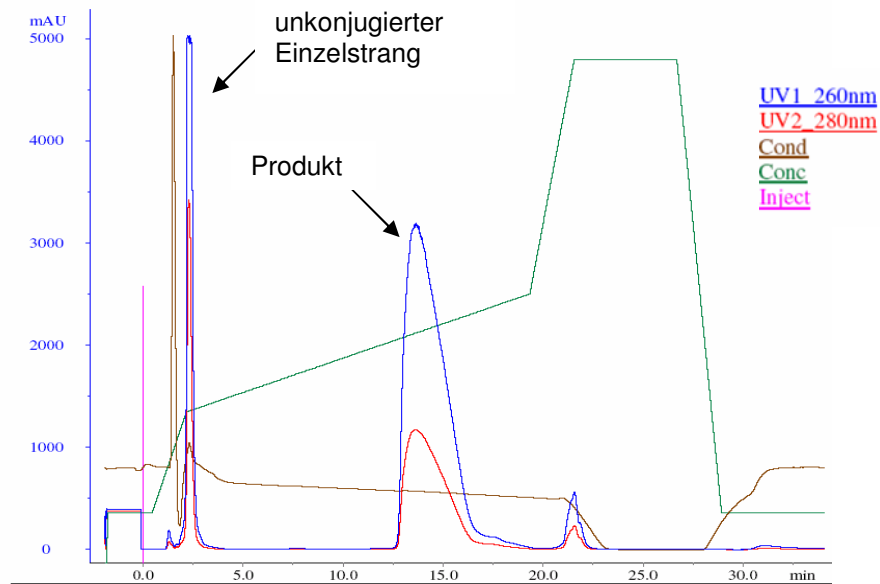


Abbildung 3.17: Chromatogramm der Reinigung des C12-3BChol-Konjugats mittels Reversed Phase.

Bei der Reinigung des C12-3BChol Konjugats traten keine weiteren Peaks auf. Die unkonjugierte RNA ließ sich auf Grund des Hydrophobizitätsunterschieds sehr gut vom Produkt trennen (Abb.3.17), welches anschließend per LC-MS analysiert wurde.

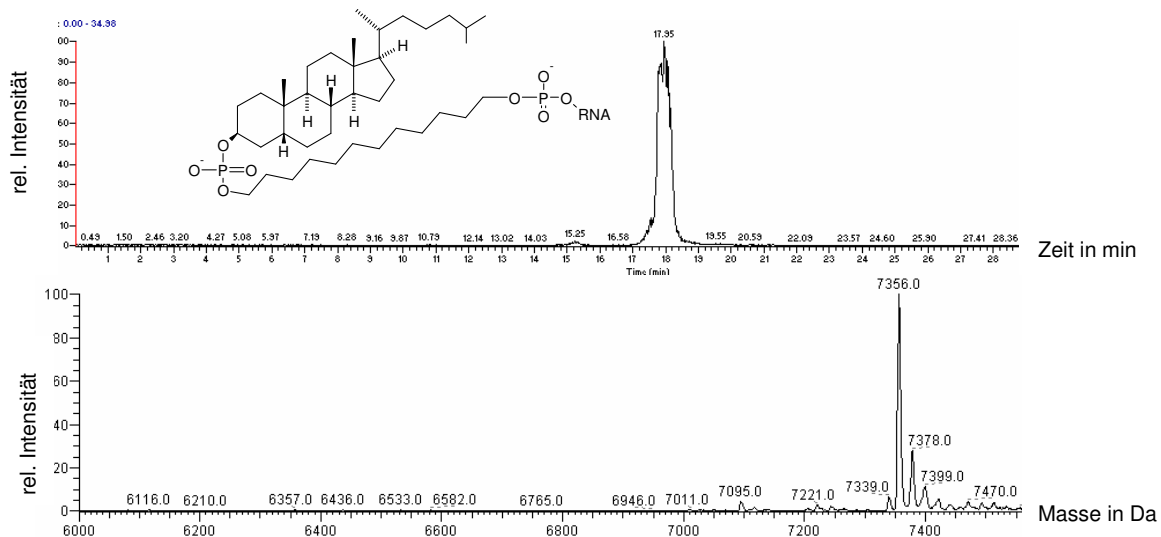


Abbildung 3.18: LC-Spur und ESI-MS Spektrum des C12-3BChol-Konjugats nach präparativer Reinigung.

Wie aus Abbildung 3.18 in der LC-Analyse ersichtlich, eluierte die gewünschte Verbindung nach 18 min und konnte anhand der theoretisch ermittelten Masse von 7357,9 Da als das gesuchte Konjugat identifiziert werden.

Bei der Synthese der verzweigten Cholesterin-Modifikationen war eine schlechte Kopplungseffizienz beider Cholesterin-Amidite zu beobachten, so dass bei der Reaktion mit SBChol der einfach modifizierte RNA-Strang entstand, während bei der Synthese von SBTEGChol das einfach und doppelt konjugierte Produkt isoliert werden konnte.

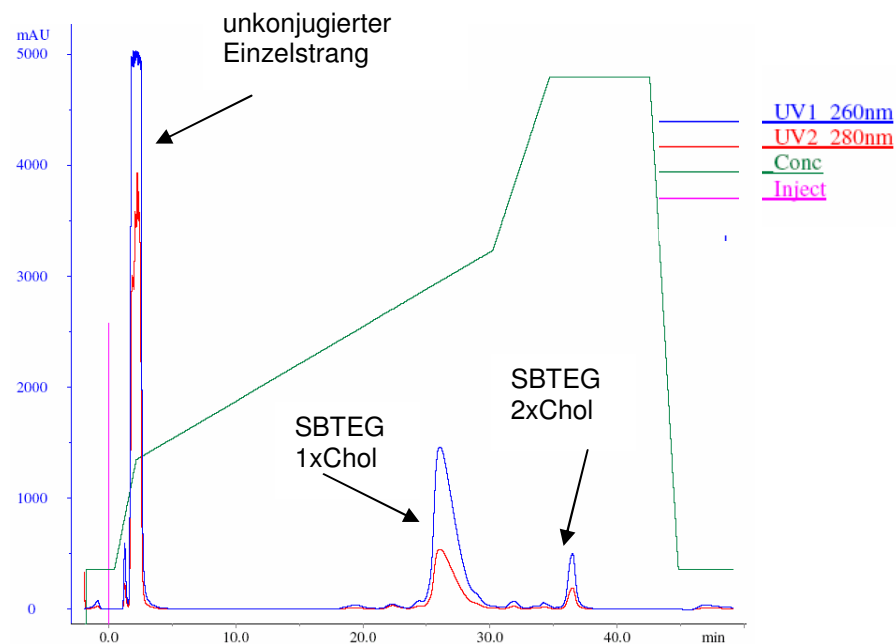


Abbildung 3.19: Chromatogramm der Reinigung des SBTEGChol Konjugats mittels Phasenumkehrchromatographie.

Abbildung 3.20 zeigt nochmals die Struktur der beiden isolierten Produkte.

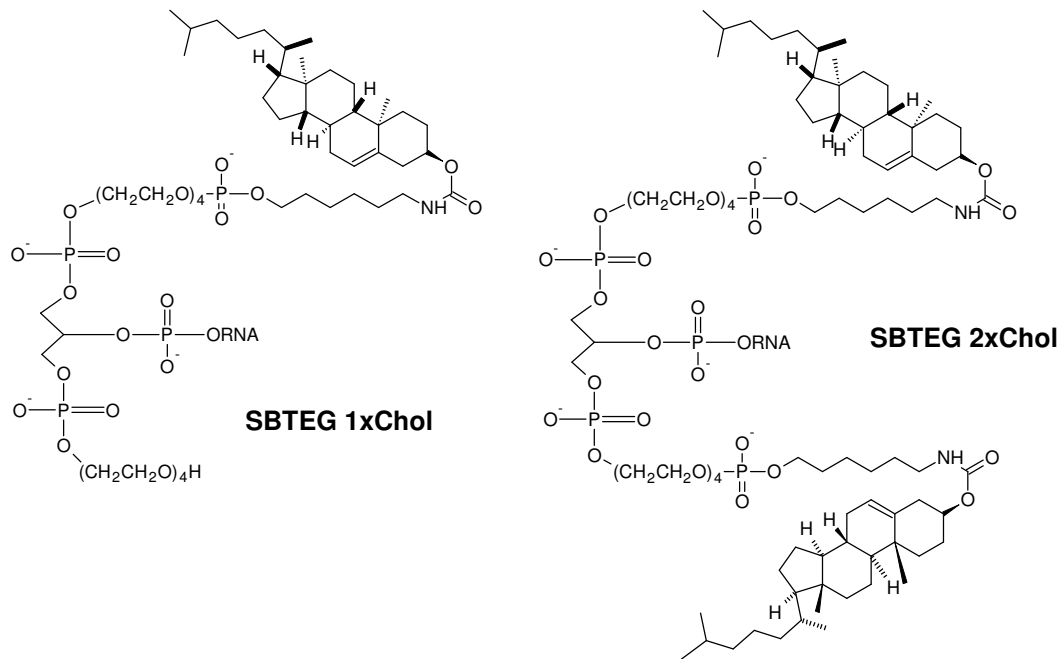


Abbildung 3.20: Gezeigt sind die bei der Synthese von SBTEGChol entstandenen Strukturen.

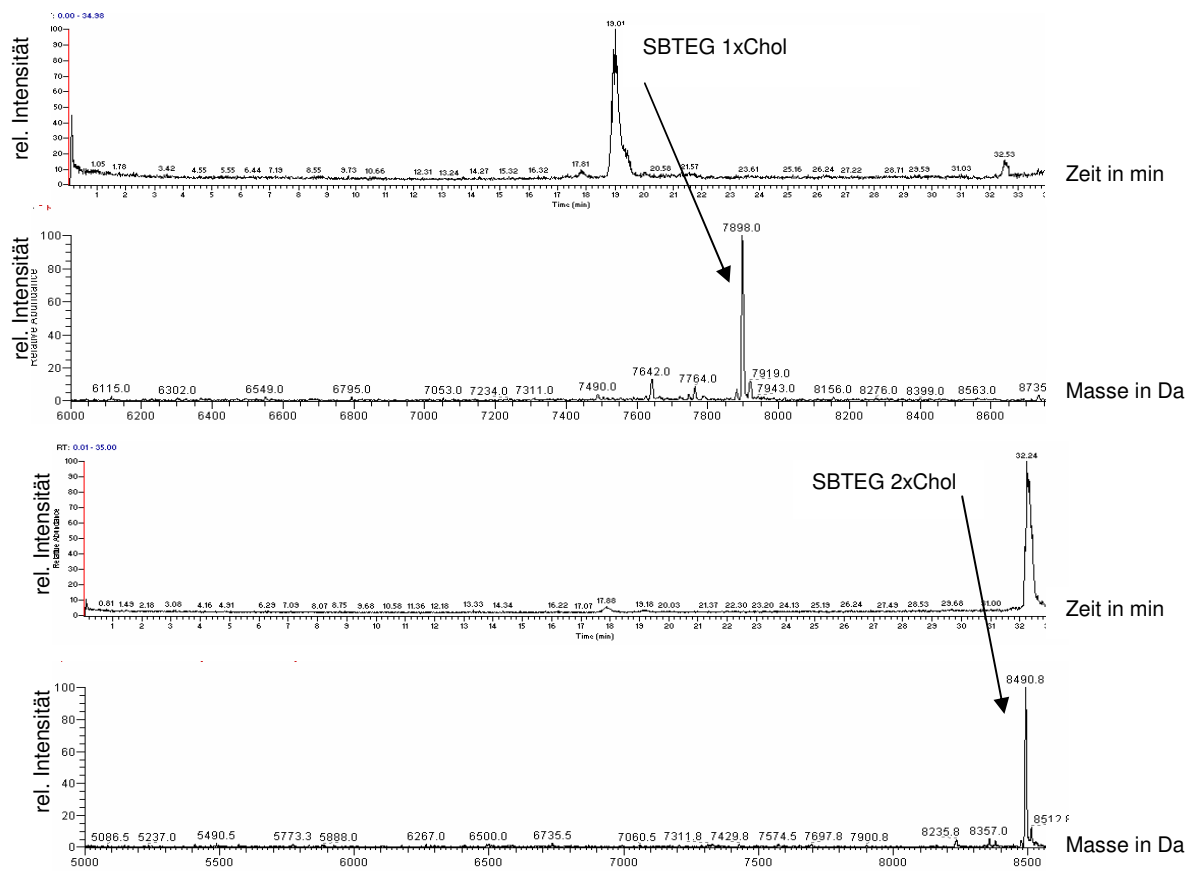


Abbildung 3.21: LC-Analyse und ESI-MS Spektren der SBTEGChol Fraktionen.

Anhand der aufgenommenen LC-MS Daten konnten beide Produkte identifiziert werden. In der LC-Spur war nach 19 min die Elution des einfach konjugierten Produkts, mit einer theoretisch ermittelten Masse von 7899,2 Da, zu detektieren. Das zweifach modifizierte Produkt eluierte nach 32,2 min und konnte der kalkulierten Masse von 8491,9 Da im ESI Spektrum zugeordnet werden (Abb. 3.21).

Die Zucker-konjugierten RNA-Einzelstränge wurden über Anionenaustauschchromatographie mit einem Lösungsmittelsystem bestehend aus 10 mM NaClO₄, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 6 M Harnstoff pH 7.4 20% ACN und 800 mM NaClO₄, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 6 M Harnstoff pH 7.4 20% ACN mit Hilfe eines Gradienten über eine Dionex Säule gereinigt. Durch die Kopplung des Galaktoseamidits verringerte sich die Wechselwirkung mit dem Anionenaustauschharz, so dass für das 2xGAL-Konjugat eine Elution vor dem unkonjugierten RNA-Einzelstrang beobachtet wurde (Abb. 3.22).

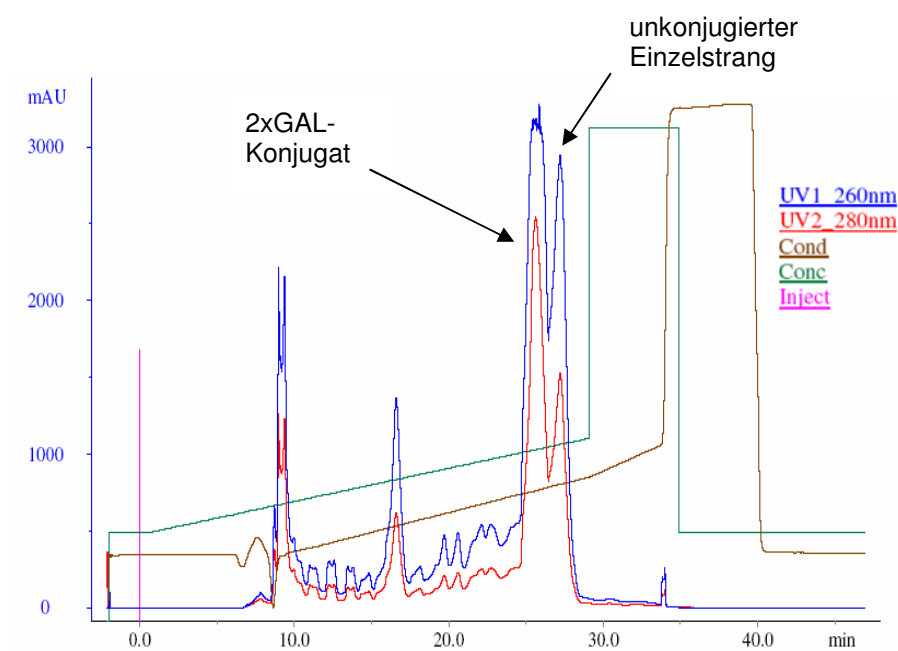


Abbildung 3.22: Chromatogramm der präparativen Reinigung des 2xGAL konjugierten RNA-Einzelstrangs mit Anionenaustauschchromatographie.

Nach präparativer Reinigung wurde das isolierte Produkt wieder mit Hilfe der LC-MS charakterisiert. Der LC-Lauf und das entsprechende ESI-MS Spektrum finden sich in Abbildung 3.23.

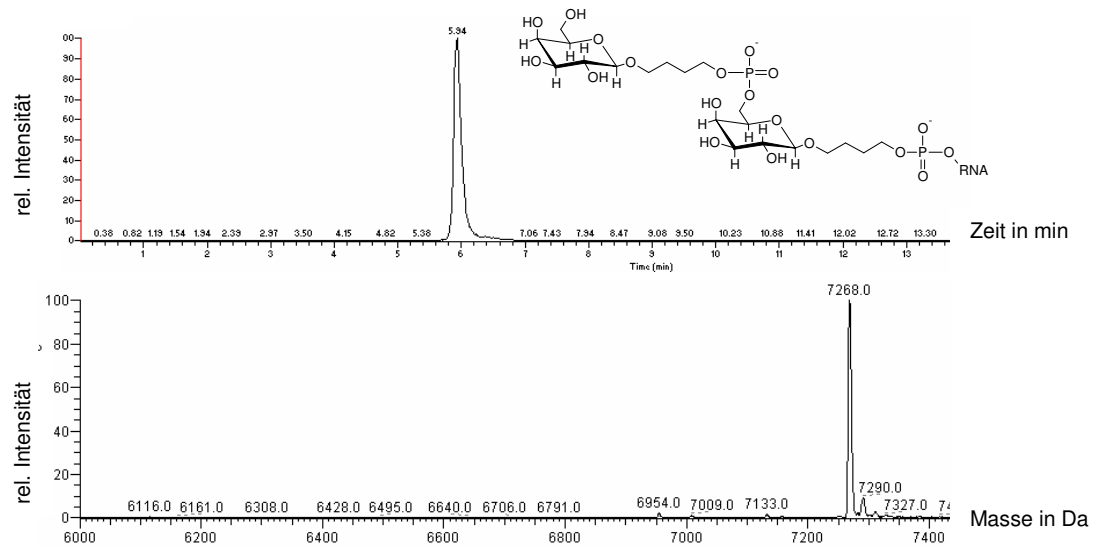


Abbildung 3.23: LC-Analyse und ESI-MS Spektrum des 2xGAL konjugierten Einzelstrangs nach HPLC-Reinigung.

Nach 5,89 min eluierte das konjugierte Produkt, welches eine Masse von 7268 Da aufwies und in hoher Reinheit gewonnen werden konnte.

Die verzweigten Zucker-Modifikationen SBGAL und SBTEGGAL wurden ebenfalls über die gleiche Methode gereinigt. Allerdings erwies sich die chromatographische Abtrennung von der unkonjugierten RNA als wesentlich schwieriger, so dass ein Kompromiss zwischen Reinheit und Ausbeute eingegangen werden musste. In Abbildung 3.24 ist beispielhaft die präparative Reinigung des SBTEGGAL Konjugats mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie gezeigt.

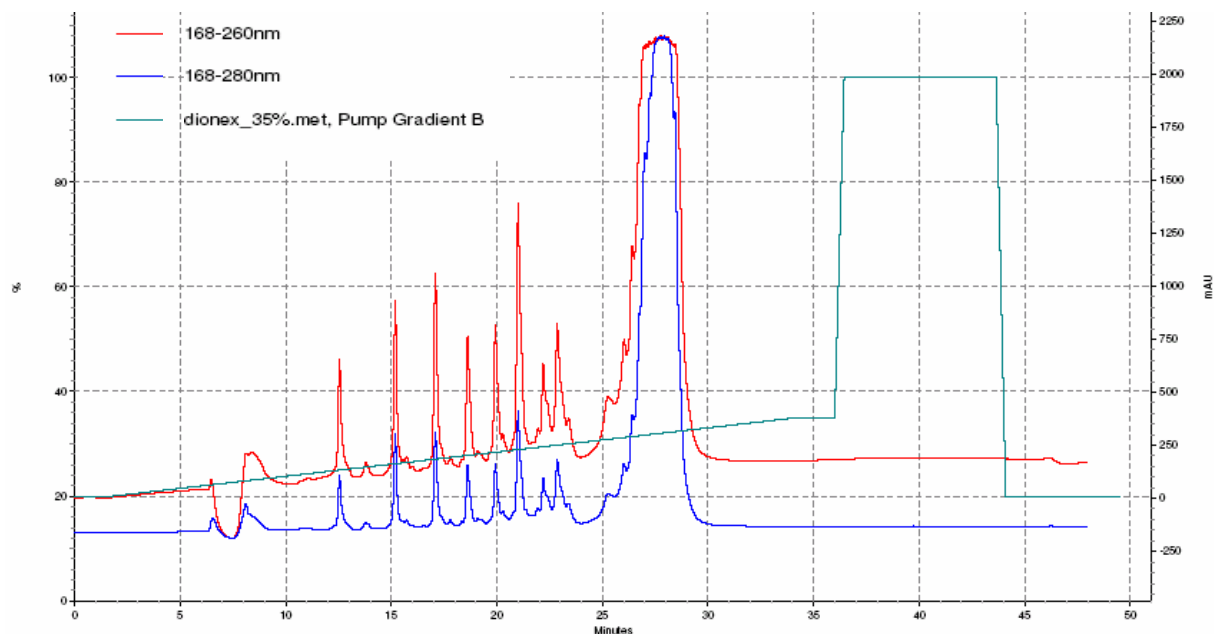


Abbildung 3.24: Chromatogramm der präparativen Reinigung des SBTEGGAL Konjugats mit Anionenaustauschchromatographie.

Die Reinigung über den Anionenaustauscher lieferte eine gute Trennung des Volllängenprodukts von den Fehlersequenzen und es konnte ein Hauptpeak isoliert werden. Im Anschluss erfolgte die Analyse mittels LC-MS (siehe Abb. 3.25).

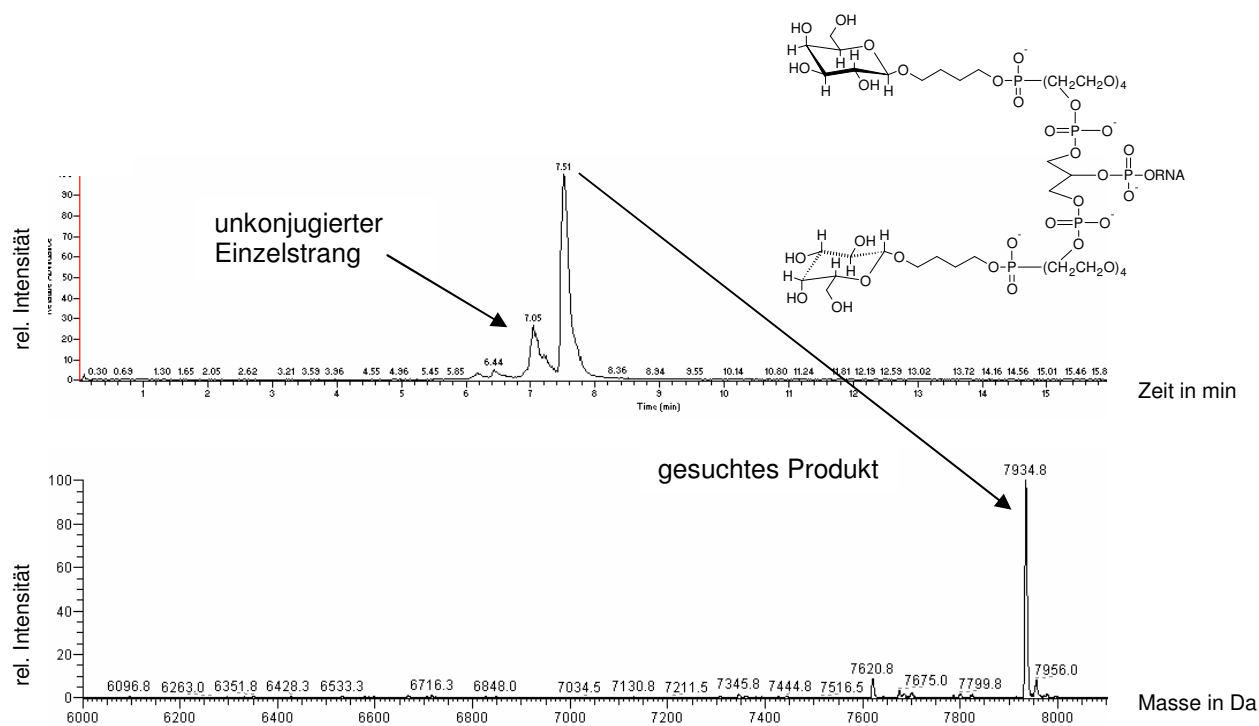


Abbildung 3.25: LC-Analyse und ESI-MS Spektrum des SBTEGGAL konjugierten Einzelstrangs nach präparativer Reinigung über einen Anionenaustauscher.

Die LC-Analyse zeigte zwei Peaks. Das erste Rohprodukt eluierte bei 7,05 min und stellt den unkonjugierten Einzelstrang dar. Das Hauptprodukt eluierte bei 7,51 min und konnte anhand des ESI-MS Spektrums als das gewünschte Konjugat mit einer theoretischen Masse von 7936,9 Da identifiziert werden (Abb. 3.25). Zwar ließ sich die unkonjugierte RNA im analytischen LC-Lauf vom gewünschten Produkt trennen, aber eine Übertragung der Bedingungen für die präparative Reinigung war nicht möglich, da die Verhältnisse des analytischen Laufs der LC-Analyse (C_{18} Säulenmaterial und 2,5 μm) nicht in der präparativen Methode (C_8 Säulenmaterial und 5 μm) angewandt werden konnten.

Weiterhin wurden die RNA-Einzelstränge nach der Synthese, der anschließenden chromatographischen Reinigung mittels HPLC und nachfolgenden Entsalzung hinsichtlich der Ausbeuten durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm untersucht. In der folgenden Tabelle 3.2 sind nochmals alle wichtigen Parameter der RNA-Synthese aller Konjugate zusammengefasst. Aus den optischen Dichten bei 260 nm der gereinigten Einzelstränge konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten die Konzentration berechnet werden. Dabei wurde angenommen, dass die konjugierten Gruppen keinen Beitrag zur Absorption bei 260 nm leisten. Des Weiteren wurde über eine analytische Anionenaustauschchromatographie die Reinheit der isolierten Produkte bestimmt und diese nur bei einer Reinheit größer 85% zur Hybridisierung mit dem entsprechenden Antisense Strang eingesetzt.

Tabelle 3.2: Angegeben sind die verwendeten Abkürzungen der Konjugate, die optischen Dichten bei 260 nm, die daraus berechneten Konzentrationen und notwendigen Extinktionskoeffizienten, die kalkulierten und experimentell bestimmten Massen eines jeden Konjugats.

Bezeichnung	Rohausbeute [OD/ml]	Ausbeute [OD/ml]	ϵ [l/mol*cm]	Konz. [μM]	Masse kalkuliert [$\text{M}+\text{H}^+$]	Masse exp. bestimmt
Cyclohep	113,0	15,4	212100	72,61	6987	6985
Cyclodod	112,0	6,4	212100	30,17	7056	7055
Deh	115	18,2	212100	85,81	7158	7158
Deh + 4		11,6	212100	54,69	7161	7161
Dimethoxy	120,0	12,8	212100	60,35	7054	7054
Diphenyl	119,0	9,8	212100	46,20	7070	7069

Bezeichnung	Rohausbeute [OD/ml]	Ausbeute [OD/ml]	ϵ [l/mol*cm]	Konz. [μ M]	Masse kalkuliert [M+H ⁺]	Masse exp. bestimmt
Dibutyl	86,0	9,3	212100	59,88	7059	7058
Arg	95,0	13,6	212100	64,12	7062	7060
GlyPhe	89,0	10,2	212100	48,09	7095	7094
GlyTyr	93,0	16,7	212100	78,74	7112	7111
GlyLeu	101,0	8,5	212100	40,08	7062	7061
Carn	126,0	36,4	212100	171,62	7100	7099
Litho	107,0	29,2	212100	137,67	7360	7359
Bet	108,0	26,6	212100	125,41	7146	7144
3BChol	113,0	29,0	212100	136,73	7093	7090
C12	119,0	35,5	212100	167,37	6906	6905
C12 3BChol	135,0	33,7	212100	158,89	7357	7356
SB3BChol	78,0	14,0	212100	66,01	7696	7695
SB1xChol	184,0	4,0	212100	18,86	7368	7367
SBTEG 3BChol	177,0	33,0	212100	155,59	8209	8209
SBTEG 1xChol	200,0	16,4	212100	77,32	7899	7898
SBTEG 2xChol		3,0	212100	14,14	8491	8490
1xGAL	124,0	28,3	212100	133,43	6956	6955
2xGAL	107,0	23,7	212100	111,74	7270	7268
SBGAL	218,0	126,0	212100	594,06	7423	7423
SBTEGGAL	254,0	79,0	212100	372,47	7936	7934,8
SBTEG		42,2	212100	198,92	7311	7309
B442 SBGAL	221,5	35,2	199600	176,35	7483	7482
B442 SBTEGGAL	178,0	50,0	199600	250,30	7993	7991

3.2.2 Darstellung von Doppelstrang-RNA

Für die folgenden Experimente wurden die am 5'-Ende modifizierten Sense Stränge mit dem entsprechenden Antisense Strang hybridisiert. Die so entstandenen siRNAs waren charakteristischerweise über einen Bereich von 21 Nukleotiden doppelsträngig und wiesen einen Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende des Antisense Stranges auf. Der Sense Strang entsprach dabei der *apoB* m-RNA (ORF Position 10049 – 10071) und der Antisense Strang war komplementär zu diesem. Die durchgeführte Hybridisierung der Einzelstränge wurde mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese überprüft. Vorhandene Einzelstrang-Banden, die eventuell unterhalb der siRNA zu erkennen sind (Abb. 3.26), können auf Schwankungen bei der Konzentrationsbestimmung oder auf Pipettierungenauigkeiten zurückgeführt werden. Diese sind jedoch für *in vitro* Experimente nicht von Belang. Des Weiteren ist in Abbildung 3.26 ein kürzeres Laufverhalten der apoB-Sequenz zu erkennen, welches auf die 3'-Cholesterin-Konjugation zurückzuführen ist.

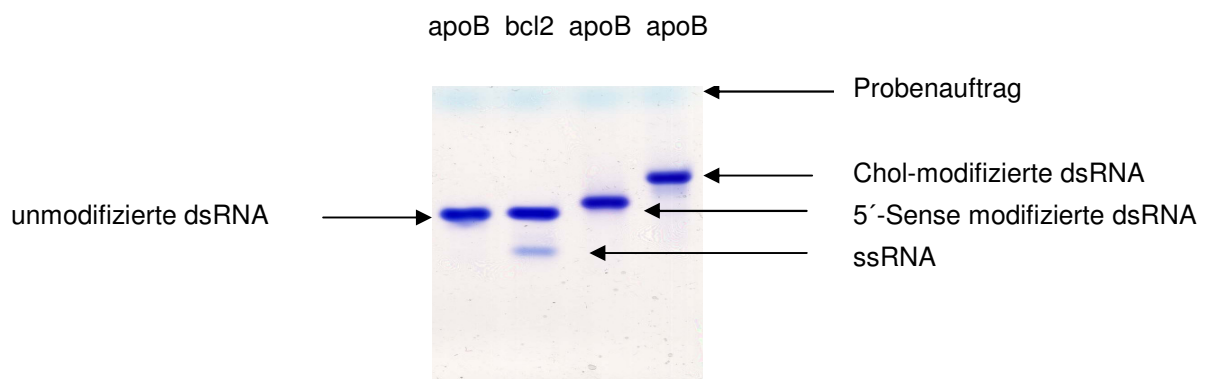


Abbildung 3.26: Überprüfung der vollständigen Hybridisierung der RNA-Einzelstränge nach nativer Elektrophorese in 10%igen Acrylamidgelen.

3.3 Analyse der siRNAs in einer humanen Leberkarzinomzelllinie

Um eine posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression nachzuweisen, musste zunächst eine Zelllinie gewählt werden, welche *apoB* in ausreichender Menge exprimiert. Hierzu wurden verschiedene Leberkarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer *apoB* Expression getestet und die optimale Zellzahl/Ansatz anhand einer Verdünnungsreihe bestimmt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der erzielten Daten wurde die humane Zelllinie HuH7 für die verschiedenen Transfektions- und Inkubationsexperimente ausgewählt und die Reduktion von ApoB durch die RNA-Interferenz indirekt mittels ELISA auf der Proteinebene nachgewiesen. Ein direkter

Nachweis der Reduktion von *apoB* erfolgte mit Hilfe der b-DNA Methode, durch Detektion der in den Zellen vorhandenen m-RNA.

3.3.1 Posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression *in vitro* durch Transfektion der siRNAs

Um die *in vitro* Aktivität der synthetisierten siRNAs zu bestimmen, wurden diese zunächst mit Hilfe eines Transfektionsreagenzes in die HuH7 Zellen eingebracht. Die so gewonnenen Daten sollten im Anschluss mit den Daten aus den Inkubationsversuchen ohne Transfektionsreagenz verglichen werden. Hierzu wurden verschiedene Transfektionsmittel, bei einer siRNA-Endkonzentration von 100 nM und 15000 Zellen/Ansatz, getestet. Am effektivsten zeigte sich hier Oligofectamine. 48 h nach der Transfektion erfolgte der gleichzeitige Nachweis des ApoB Proteins im Zellüberstand mittels ELISA und der m-RNA mit Hilfe der b-DNA Methode.

3.3.1.1 Reduktion des ApoB Proteins

Da es sich bei dem nachzuweisenden ApoB um ein sekretorisches Protein handelt, konnte die Bestimmung der Proteinmenge anhand des Zellüberstandes aus dem Transfektionsansatz erfolgen. Hierzu wurde ein klassischer Sandwich-ELISA genutzt, bei dem aus einem Gemisch, mit Hilfe von zwei spezifischen Antikörpern, nur ein bestimmtes Protein über die Umsetzung eines zugegebenen Substrats spektrometrisch nachgewiesen wird.

Die folgende Abbildung 3.27 zeigt das Ergebnis der durchgeführten Transfektionsexperimente auf Proteinebene. Dabei wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Dreifachbestimmungen die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet und diese auf die mitgeführten Transfektionsansätze der Negativkontrollen (gelb) bezogen. Der Mittelwert dieser Kontrollansätze wurde dabei als 100% ApoB Gehalt angenommen. Des Weiteren wurden mit Hilfe des „Studentischen T-Tests“ die P-Werte für signifikante Reduktionen berechnet, wobei die Negativkontrollen die eine Matrix und die Mittelwerte eines siRNA-Konjugats die andere Matrix repräsentierten. Bei der Berechnung der P-Werte wurde eine doppelseitige Beziehung (gepaarter T-Test) angenommen und die Werte mit gleicher Varianz eingestuft, da sowohl die Kontroll-, als auch die zu untersuchenden Ansätze gleiche Fehlerschwankungen aufweisen

können. So konnte für alle P-Werte ein Ergebnis $< 0,05$ erhalten werden, was für eine hohe Signifikanz der ermittelten Reduktionen spricht. Ebenso wurde eine unmodifizierte apoB Sequenz bei allen Experimenten mitgeführt, um eine eventuelle Beeinträchtigung der Aktivität durch die 5'-Modifikation des Sense Stranges zu untersuchen.

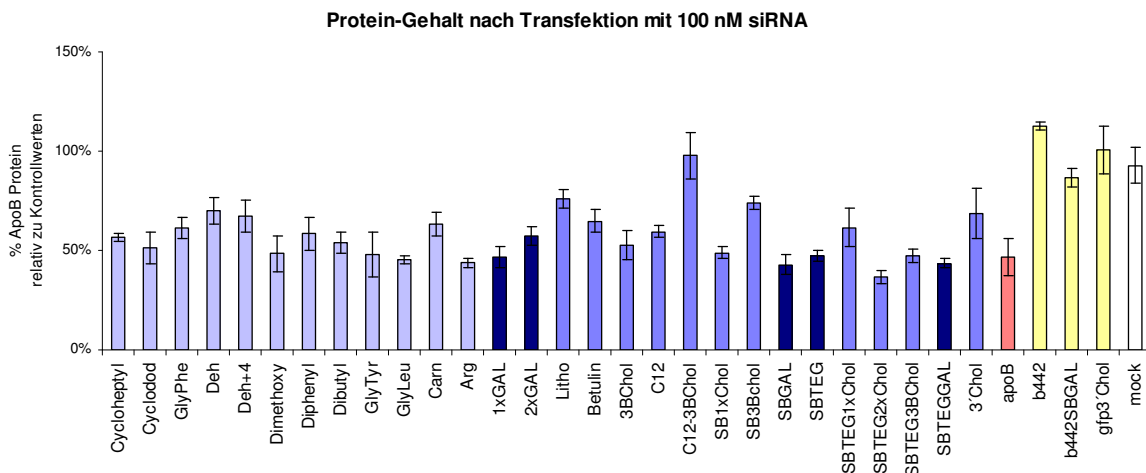


Abbildung 3.27: Gezeigt ist der relative ApoB Protein-Gehalt der humanen Zelllinie HuH7 in % nach Transfektion in Bezug zu den Mittelwerten der Negativkontrollen (gelb). Aufgeführt sind die Amin-, Aminosäuren- und Dipeptid-modifizierten siRNAs (hellblau), die Zucker-konjugierten Moleküle (dunkelblau) sowie die Steroid-derivatisierten siRNAs (blau). Weiterhin ist die mock-Kontrolle ohne siRNA (weiß) und die unmodifizierte Sequenz apoB (rosa) dargestellt. Der Studentische T-Test lieferte Werte von $P < 0,05$, so dass von einer Signifikanz der erhaltenen Reduktionen ausgegangen werden kann.

Bei den Transfektionen mit Oligofectamine zeigten alle modifizierten siRNAs eine Reduktion, mit Ausnahme des C12-3BChol Konjugats. Für alle Zucker-modifizierten siRNAs (Abb. 3.27 dunkelblau) waren Reduktionen im Bereich der unmodifizierten apoB Sequenz (rosa) von 50% zu verzeichnen. Die GlyLeu-, Arg-, und SBTEG2xChol-Konjugate zeigten sogar einen noch höheren Inhibitionseffekt von etwa 60%. Des Weiteren ist anzumerken, dass die verwendeten Negativkontrollen (gelb), sowie der mock-Ansatz ohne siRNA (weiß) im Vergleich zum Mittelwert aller Negativkontrollen, wie gewünscht, keine Reduktion von ApoB hervorrufen konnten.

3.3.1.2 Reduktion der *apoB* m-RNA

Um eine posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression nachzuweisen, muss dies auf m-RNA Ebene erfolgen. So wurde mit Hilfe der b-DNA Methode der relative

Gehalt an m-RNA zum Zeitpunkt der Zellyse durch Hybridisierung mit spezifischen Oligodesoxynukleotiden und Auslesen der Lumineszenz bestimmt, indem wie bereits beschrieben der Mittelwert aller Negativkontrollen als Bezugspunkt von 100% *apoB* m-RNA angesehen wurde. Ebenfalls wurden analog zu den ELISA Experimenten die P-Werte, als Maß für die Signifikanz der erhaltenen m-RNA Reduktionen bestimmt (siehe Kapitel 3.3.1.1).

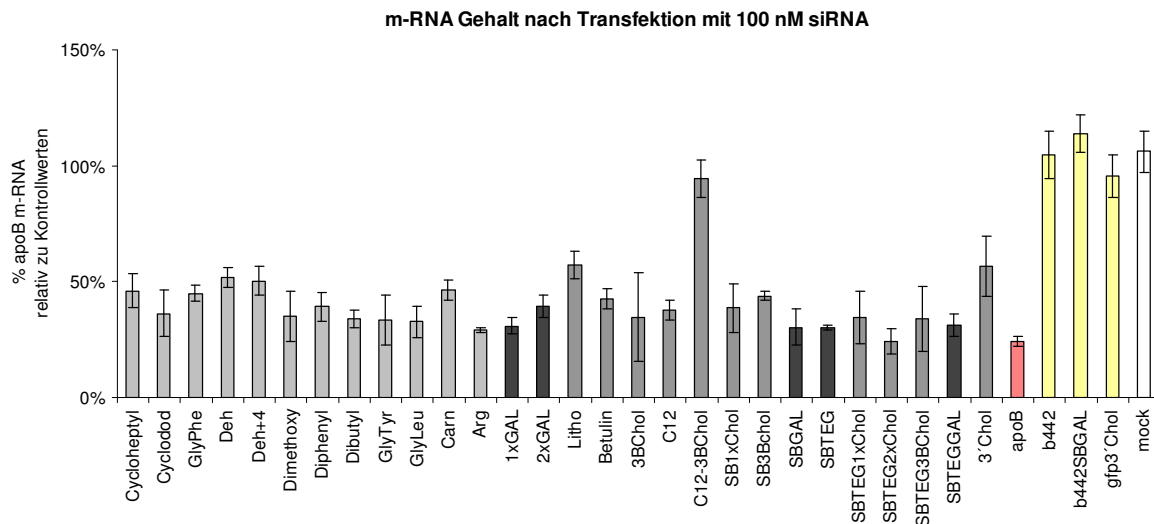


Abbildung 3.28: Dargestellt ist der m-RNA Gehalt der humanen Zelllinie HuH7 in % relativ zu den Kontrollwerten (gelb) nach Transfektion mit 100 nM siRNA. Aufgeführt sind die Amin-, Aminosäuren- und Dipeptid-modifizierten siRNAs (hellgrau), die Zucker-konjugierten Moleküle (dunkelgrau) sowie die Steroid-derivatisierten siRNAs (grau). Ebenfalls gezeigt ist die mock-Kontrolle, welche keine siRNA enthielt (weiß) und die unmodifizierte apoB Sequenz (rosa). Durch Einsatz des Studentischen T-Tests konnte die Signifikanz der erhaltenen Werte bestätigt werden ($P < 0,01$).

Vergleicht man die Inhibitorseffekte auf Protein- (Abb. 3.27) und m-RNA Ebene (Abb. 3.28), so lässt sich die gleiche Tendenz erkennen. Auch hier konnte bei allen Konjugaten, bis auf C12-3BChol, eine Abnahme von *apoB* nachgewiesen werden, so dass ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der m-RNA und dem Proteingehalt deutlich gemacht werden kann. Der inhibitorische Effekt ist auf m-RNA Ebene etwa 15 % größer als auf Proteinebene (siehe Abschnitt 4). Die Reduktion der m-RNA mit der unmodifizierten apoB siRNA (rosa) betrug fast 80 %, während mit allen modifizierten siRNAs eine geringere Abnahme der *apoB* m-RNA festzustellen war. Der Studentische T-Test lieferte hier Werte kleiner als 0,01, so dass von einer hohen Signifikanz der erhaltenen Werte ausgegangen wird.

3.3.2 Posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression *in vitro* durch die siRNAs ohne Transfektionshilfe

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, siRNAs so zu modifizieren, dass diese ohne Transfektionshilfe in die Zelle aufgenommen werden und der RNA-Interferenzeffekt durch die eingeführte Modifikation nicht negativ beeinflusst wird. Die siRNAs wurden ohne Transfektionshilfe mit den Zellen inkubiert und anschließend der ApoB Protein- und m-RNA Gehalt, wie bereits unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben, ermittelt. Auch hier wurden zuvor einige Evaluierungen hinsichtlich der Zellzahl und der siRNA Konzentration vorgenommen, so dass schließlich mit 20000 Zellen/well und einer Endkonzentration von 10 μ M an siRNA gearbeitet wurde.

3.3.2.1 Reduktion des ApoB Proteins

Falls eine der modifizierten siRNAs in der Lage war, die Zellmembran ohne Transfektionshilfe zu überwinden und in das Zytoplasma zu gelangen, sollte in diesem Fall eine Reduktion des ApoB Proteins zu verzeichnen sein, da alle siRNAs, mit Ausnahme des C12-3BChol Konjugats, bei der Transfektion einen deutlichen Rückgang des ApoB Proteins und der *apoB* m-RNA zeigten.

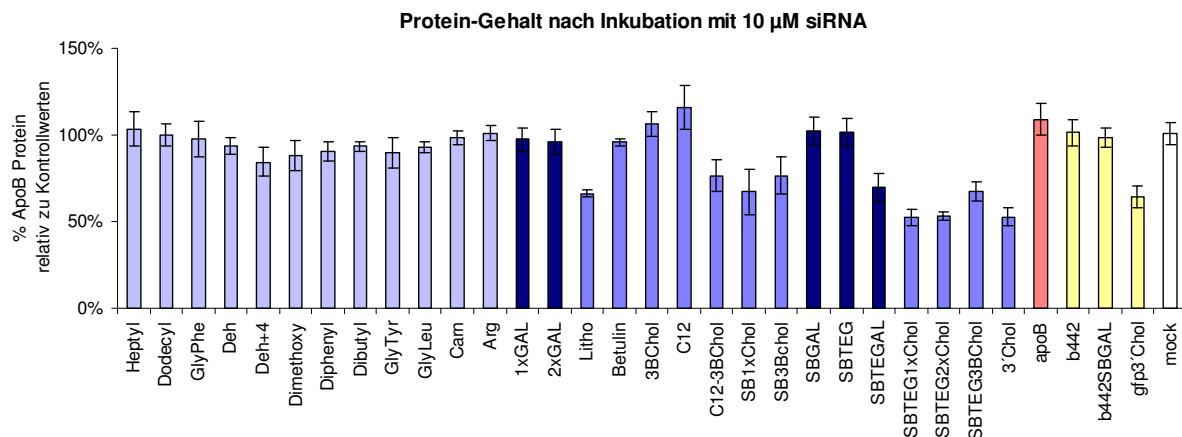


Abbildung 3.29: Gezeigt ist der relative ApoB Protein-Gehalt der humanen Zelllinie HuH7 in % nach Inkubation ohne Transfektionsreagenz in Bezug zum Mittelwert der Negativkontrollen (gelb). Aufgeführt sind die Amin-, Aminosäuren- und Dipeptid-modifizierten siRNAs (hellblau), die Zucker-konjugierten Moleküle (dunkelblau) sowie die Steroid-derivatisierten siRNAs (blau). Weiterhin ist die mock-Kontrolle ohne siRNA (weiß) und die unmodifizierte Sequenz apoB (rosa) dargestellt. Mit Hilfe des Studentischen T-Tests konnten Werte von $P < 0,05$ erhalten werden und somit kann von einer Signifikanz der Reduktionen ausgegangen werden.

Wie aus Abbildung 3.29 ersichtlich, konnte mit den Amin-, Aminosäuren- und Dipeptid-konjugierten siRNAs (Abb. 3.29 hellblau) keine Reduktion des ApoB Proteins gezeigt werden. Auch mit dem Betulin und 3BChol-Konjugat (blau) ließ sich keine Hemmung der ApoB Synthese nachweisen. Lediglich alle Cholesterin-modifizierten siRNAs (blau) bewirkten eine statistisch signifikante Senkung des Proteingehalts um etwa 50%. Des Weiteren konnte für das Litho-, das C12-3BChol-, das SB3BChol, sowie das SBTEG3BChol-Konjugat (blau) eine Reduktion von etwa 30% beobachtet werden. Aus der Gruppe der Zucker-modifizierten siRNAs zeigte die SBTEGGAL-gekoppelte siRNA (dunkelblau) einen inhibitorischen Effekt von ca. 40%. Wie zu erwarten zeigte die unmodifizierte apoB Sequenz (rosa) keine Auswirkungen auf das ApoB Protein, da von einer Aufnahme ohne Transfektionsreagenz nicht auszugehen ist.

3.3.2.2 Reduktion der *apoB* m-RNA

Um eine Aussage über die erhaltenen Interferenzeffekte auf Proteinebene treffen zu können, musste zunächst auch der Effekt auf m-RNA Ebene aufgezeigt werden. Dazu wurden die Zellen der Inkubationsexperimente 48 h post Inkubation lysiert und wie bereits beschrieben der relative m-RNA Gehalt ermittelt (Abschnitt 3.3.1.2). Auch hier wurde wieder die Signifikanz der Reduktion mit Hilfe des T-Tests ermittelt und es wurden Werte $< 0,01$ erhalten. In Abbildung 3.30 ist das Ergebnis graphisch dargestellt.

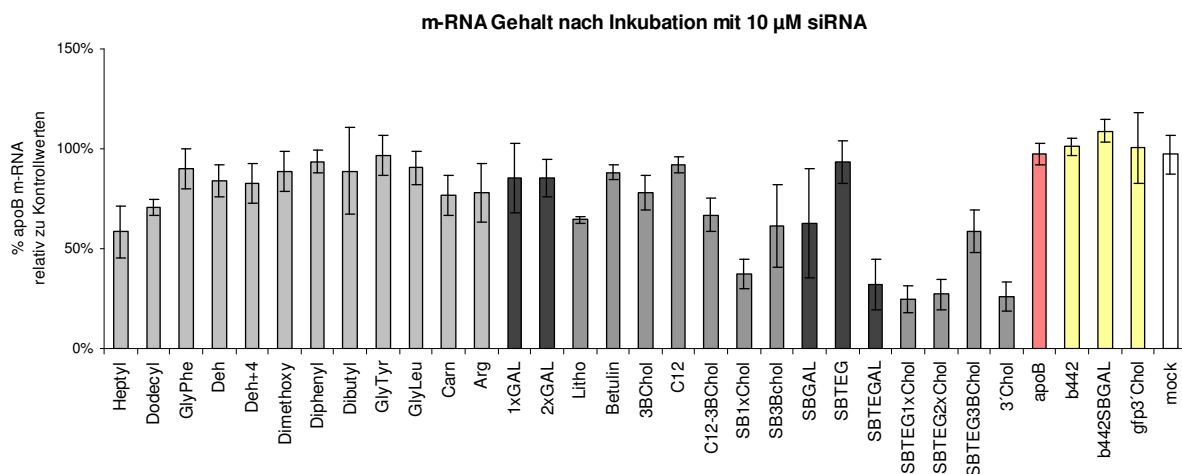


Abbildung 3.30: Dargestellt ist der m-RNA Gehalt der humanen Zelllinie HuH7 in % relativ zu den Kontrollwerten (gelb) nach Inkubation ohne Transfektionsreagenz mit 10 μ M siRNA. Aufgeführt sind die Amin-, Aminosäuren- und Dipeptid-modifizierten siRNAs (hellgrau), die Zucker-konjugierten

Moleküle (dunkelgrau) sowie die Steroid-derivatisierten siRNAs (grau). Ebenfalls gezeigt ist die mock-Kontrolle (weiß), welche keine siRNA enthielt und die unmodifizierte apoB Sequenz (rosa), ($P < 0,01$).

Der Nachweis der m-RNA bestätigte, dass die Cholesterin-modifizierten siRNA (Abb. 3.30 grau) einen starken inhibitorischen Effekt ausüben. So konnten Reduktionen des m-RNA Gehalts mit den SBTEG-Chol Konjugaten bis zu 70% erreicht werden. Ebenso war auch ein Effekt der Litho- und der 3BChol modifizierten siRNAs (grau) zu beobachten. Wie auch schon auf Proteinebene, führte das SBTEGGAL-Konjugat (dunkelgrau) zu einer Hemmung der posttranskriptionellen Genexpression und zeigte eine Reduktion der *apoB* m-RNA von ca. 60%. Des Weiteren wurde auch eine Abnahme des m-RNA Gehalts um etwa 25% mit der SBGAL modifizierten Sequenz (dunkelgrau) erzielt. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass die unmodifizierte apoB siRNA (rosa) nicht in der Lage war, eine Reduktion der *apoB* m-RNA hervorzurufen.

3.3.3 Analyse einer Dosis-Wirkungs-Beziehung

Eine biologische Substanz muss die Fähigkeit besitzen, in einer konzentrationsabhängigen Weise einen bestimmten Effekt auszulösen. Dieses Phänomen wird als Dosis-Wirkungs-Beziehung bezeichnet und soll im folgenden Abschnitt mit ausgesuchten siRNA-Konjugaten näher untersucht werden.

Bei den bereits erläuterten Inkubationsexperimenten (Abschnitt 3.3.2) stellte sich heraus, dass Cholesterin-konjugierte siRNAs besonders wirksam die ApoB Expression unterbinden. Da in der Literatur schon einige Angaben über Chol-Modifikationen zu finden sind (siehe Kapitel 1.2 und 1.3), richtete sich das Augenmerk der folgenden Experimente auf die Galaktose-konjugierten siRNAs, da sich auf m-RNA Niveau bei einer Konzentration von 10 μM siRNA ebenfalls eine Reduktion von 60% mit dem SBTEGGAL-Konjugat nachweisen ließ (Abschnitt 3.3.2.2, Abb. 3.30).

3.3.3.1 Dosis-Wirkung bei Transfektion

Zunächst sollte eine Abhängigkeit des inhibitorischen Effekts von der Konzentration der siRNA bei der Transfektion nachgewiesen werden. Dazu wurde, wie bereits beschrieben, transfiziert (Abschnitt 3.3.1) und die siRNA in Konzentrationen von 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM eingesetzt. Es wurden wieder die Mittelwerte aus drei

unabhängigen Experimenten (Dreifachbestimmung) auf den Mittelwert aller Kontrollen normiert (angenommen 100% ApoB Gehalt), welche nur in der höchsten Konzentration von 100 nM transfiziert wurden und die entsprechenden Standardabweichungen und P-Werte für die ELISA und b-DNA Untersuchungen ermittelt. Die graphischen Darstellungen der ELISA und b-DNA Auswertungen finden sich in Abbildung 3.31 A und 3.31 B.

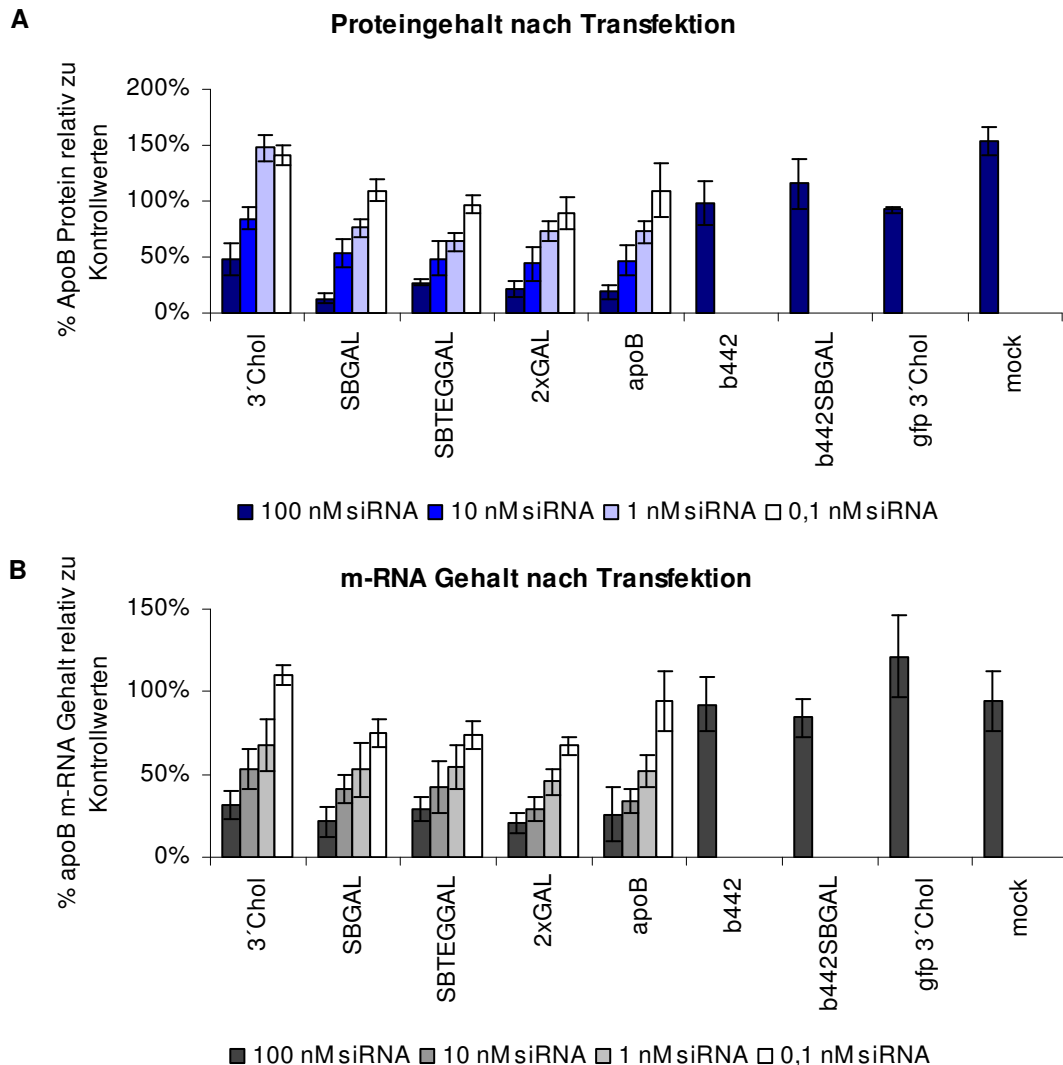


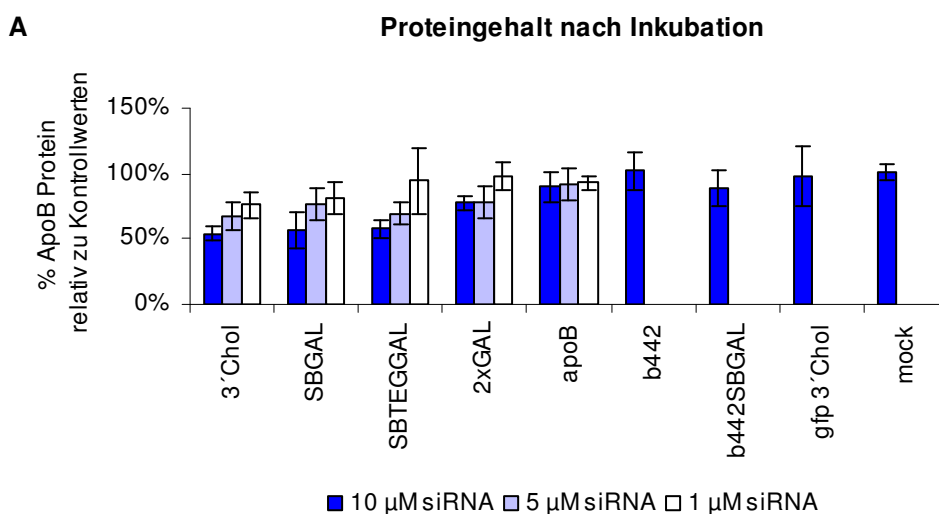
Abbildung 3.31: Gezeigt ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung der inhibitorischen Effekte von 3'-Chol und GAL-konjugierten siRNAs und der unmodifizierten Sequenz apoB in humanen HuH7 Zellen nach Transfektion mit 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM siRNA auf Protein (A)- und m-RNA Ebene (B) bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen b442, b442SBGAL und gfp 3'-Chol ($P < 0,001$).

Sowohl auf Protein-, als auch auf m-RNA Ebene konnte eine Abnahme der Expression von ApoB in einer dosisabhängigen Weise beobachtet werden. Dabei konnte in der höchsten Konzentration von 100 nM mit den Galaktose-konjugierten

siRNAs eine Reduktion von ca. 80% erzielt werden. Selbst mit der geringsten Konzentration von 0,1 nM ließen sich noch Abnahmen bis zu 30% des m-RNA Gehalts nachweisen. Der inhibitorische Effekt der modifizierten siRNAs war vergleichbar mit dem der unmodifizierten apoB Sequenz. Somit hatte die Modifikation des Sense Stranges keine negativen Auswirkungen auf die Aktivität der siRNAs. Auch für das 3'-Chol Konjugat konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden. Der Reduktionseffekt ist bei der höchsten eingesetzten Konzentration geringer als bei den Zucker-konjugierten Molekülen. Wie angenommen, zeigten die unspezifischen Negativkontrollen sowie der mock-Ansatz ohne siRNA keinen Interferenzeffekt.

3.3.3.2 Dosis-Wirkung ohne Transfektionshilfe

Da es sich bei den synthetisierten siRNAs um Moleküle handelte, die ohne Transfektionsreagenz die Zellmembran passieren sollten, musste auch hier eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufgezeigt werden, um eine definierte Aussage über die inhibitorischen Effekte treffen zu können. So wurden dieselben siRNAs wie bei dem vorangegangenen Transfektionsexperiment in Endkonzentrationen von 10 μ M, 5 μ M und 1 μ M mit den Zellen inkubiert und schließlich der ApoB Proteingehalt und die Menge an m-RNA in den Zellen bestimmt. Ebenso wurde wieder der Studentische T-Test eingesetzt, um eine Signifikanz der erhaltenen Werte nachzuweisen. Die Abbildungen 3.32 A und B geben die gemessenen inhibitorischen Effekte graphisch wieder.



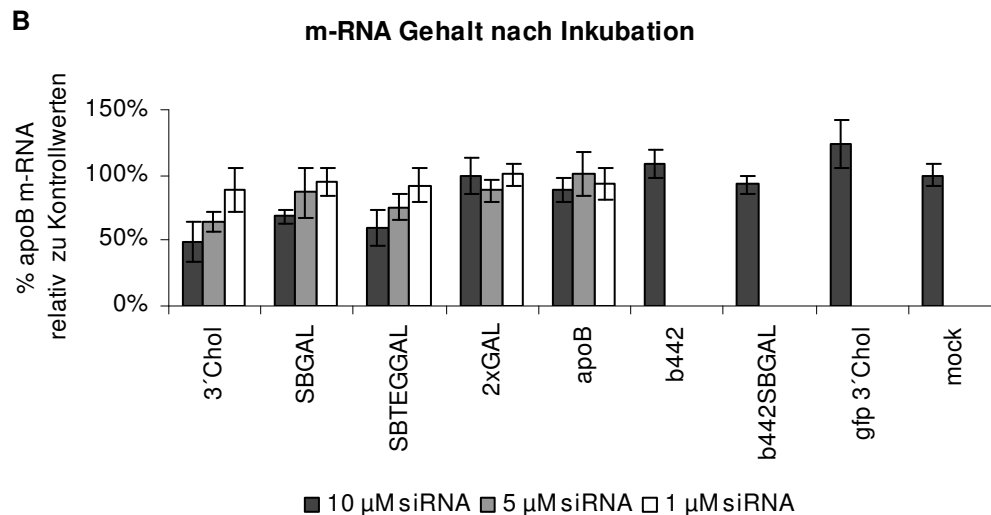


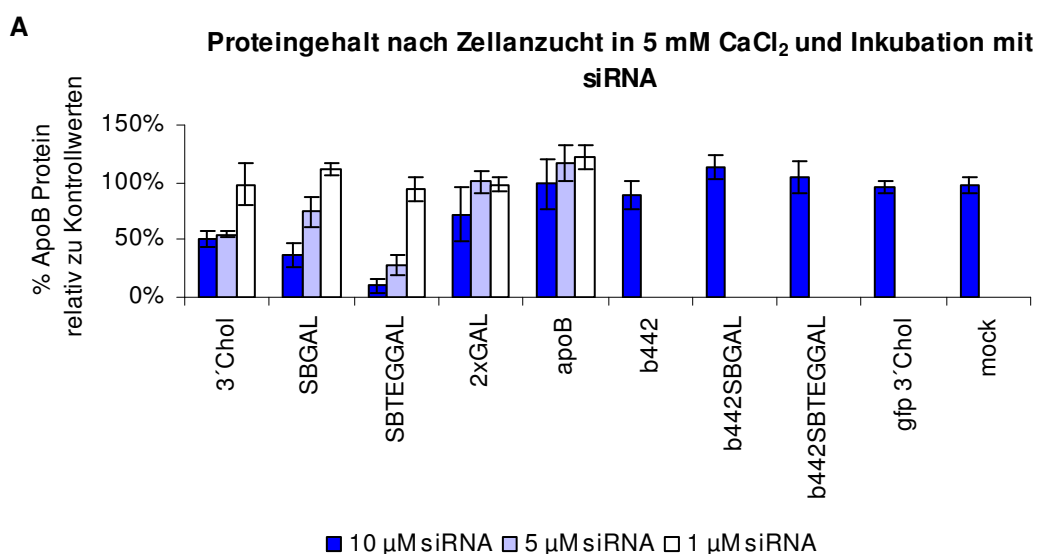
Abbildung 3.32: Gezeigt ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Interferenzeffekte 3'-Chol- und Zucker-konjugierter siRNAs, sowie der unmodifizierten apoB Sequenz in humanen HuH7 Zellen nach Inkubation mit 10 µM, 5 µM und 1 µM siRNA auf Protein (A)- und m-RNA Ebene (B) bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen b442, b442SBGAL und gfp 3'-Chol ($P < 0,005$ für 10 µM siRNA).

Bei Inkubation ohne Transfektionsreagenz konnte eine dosisabhängige Reduktion von ApoB sowohl auf Protein- als auch auf m-RNA-Ebene für die verzweigten Konjugate SBGAL und SBTEGGAL nachgewiesen werden (Abb. 3.32). Es zeigte sich ein inhibitorischer Effekt von ca. 45% bei der höchsten Konzentration mit der SBTEGGAL-konjugierten siRNA auf Protein- und m-RNA Ebene. Für das linear konjugierte Molekül 2xGAL konnte nur andeutungsweise auf Proteinebene eine geringe Dosis-Wirkung gezeigt werden, die sich auf m-RNA Ebene nicht beobachten ließ. Die 3'-Chol modifizierte siRNA war ebenfalls in der Lage, ApoB in einer dosisabhängigen Weise zu reduzieren. Dabei wurde in höchster Konzentration eine Inhibition von ca. 55% erreicht. Für die unmodifizierte apoB Sequenz wurde, wie erwartet, keine Reduktion beobachtet. Ebenso wurde keine Hemmung der Genexpression für die Negativkontrollen oder den mock- Ansatz registriert. Da bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen (10 µM) die P-Werte bestimmt wurden ($T < 0,05$), kann in diesen Fällen von einer Signifikanz des inhibitorischen Effekts ausgegangen werden.

3.3.4 Analyse einer Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Rezeptoraktivierung

In vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Galaktose-modifizierte siRNAs bei Inkubation ohne Transfektionshilfe einen RNA-

Interferenzeffekt auslösen. Dies konnte nur geschehen, wenn sie in der Lage waren die Zellmembran zu passieren und ins Zytoplasma zu gelangen. Da die unmodifizierte apoB Sequenz in diesen Experimenten keine Hemmung der Genexpression hervorrief, ist der inhibitorische Effekt der modifizierten Sequenzen daher auf eine definierte Zellaufnahme zurückzuführen. Es wurde daher angenommen, dass diese Aufnahme speziell über den Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR, auch Ashwell-Rezeptor) (Van Lenten und Ashwell, 1972d) erfolgte. Dieser ist für die Bindung und Internalisierung von Galaktose-modifizierten Molekülen bereits mehrfach beschrieben worden (siehe Kapitel 1.3). Des Weiteren wurde eine Kalziumabhängigkeit des ASGPR nachgewiesen (Van Lenten und Ashwell, 1972c), da er zu den sogenannten C-Typ Lektinen auf der Oberfläche von Hepatozyten zu rechnen ist (Drickamer, 1988b). Aus diesem Grund wurden die Zellen zwei Tage vor der siRNA Zugabe in einem Medium mit 5 mM Kalziumchlorid angezogen, um den Rezeptor optimal zu aktivieren. Zur Inkubation der siRNA wurde dieses Medium wieder entfernt und weiterhin verfahren, wie für die anderen Inkubationsexperimente beschrieben. Die siRNA wurde hier ebenfalls in drei Konzentrationen (10 μ M, 5 μ M und 1 μ M) eingesetzt, um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufzuzeigen. Außerdem wurde eine weitere Negativkontrolle verwendet, welche mit SBTEGGAL modifiziert war, um einen Effekt der Modifikation selbst auszuschließen. Abbildung 33 gibt die graphische Darstellung der inhibitorischen Effekte auf Protein- und Gen-Ebene nach Inkubation wieder.



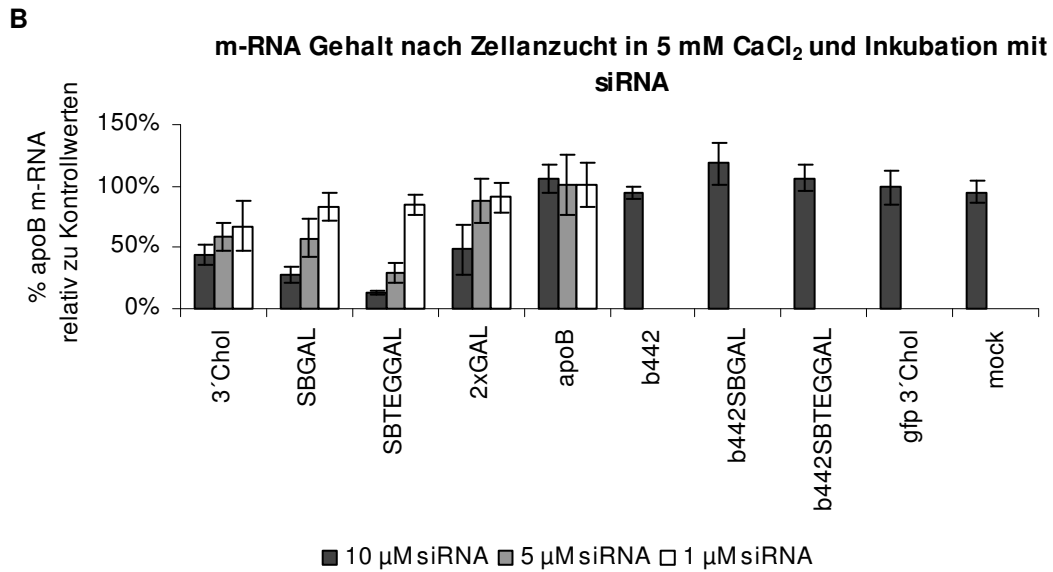


Abbildung 3.33: Zusammenfassung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Interferenzeffekte 3'-Chol- und Zucker-konjugierter siRNAs sowie der unmodifizierten apoB Sequenz in humanen HuH7 Zellen nach Inkubation mit 10 μM, 5 μM und 1 μM siRNA auf Protein (A)- und m-RNA Ebene (B) bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen b442, b442SBGAL, b442SBTEGGAL und gfp 3'-Chol nach vorheriger Zellanzucht in 5 mM CaCl₂ ($T < 0,0001$ für 10 μM siRNA).

Nach Zellanzucht in 5 mM Kalziumchlorid konnte mit den SBGAL und SBTEGGAL Konjugaten eine dosisabhängige Reduktion auf Protein- und m-RNA Ebene nachgewiesen werden (Abb. 3.33). Nach Inkubation der Zellen mit 10 μM der SBTEGGAL-modifizierten siRNA konnte ein Protein- und m-RNA Gehalt von nur noch 10% detektiert werden. Selbst bei 5 μM siRNA war eine Abnahme von 70% des Proteins und der m-RNA zu verzeichnen. Auch das SBGAL Konjugat war in der Lage, bei höchster Konzentration, einen Inhibitionseffekt von 70% in beiden Experimenten auszulösen. Das linear konjugierte Molekül 2xGAL konnte in höchster Konzentration eine 50%ige Reduktion der apoB m-RNA bewirken. Dagegen blieb die 3'-Chol modifizierte siRNA von diesem Effekt unbeeinflusst und zeigte vergleichbare Werte, wie bei der Inkubation ohne Zellanzucht in Kalziumchlorid (Kapitel 3.3.3.2). Auch die unmodifizierte apoB Sequenz sowie die Negativkontrollen, welche nur in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt wurden und der mock-Ansatz ohne siRNA lösten keine Interferenzeffekte aus. Durch die Berechnung der P-Werte ($P < 0,0001$) der höchsten Konzentration kann auch bei diesem Experiment wieder von einer sehr hohen Signifikanz der gemessenen Inhibitionen ausgegangen werden.

3.3.5 Zelluläre Aufnahmestudien mit fluoreszenzmarkierter siRNA

Nachdem für die SBGAL und SBTEGGAL-konjugierten siRNAs ein inhibitorischer Effekt gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.3.4), ist davon auszugehen, dass diese in das Zytoplasma gelangt waren. Anhand von fluoreszenzmarkierten siRNAs sollte dies auch optisch bewiesen werden. Hierzu wurde der Antisense Strang der entsprechenden siRNAs mit einem Cy3 Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende versehen. Die Zellen wurden einmal ohne und einmal mit 5 mM Kalziumchlorid angezogen und die Zucker- und Cy3- modifizierten siRNAs in einer Endkonzentration von 10 μ M zugegeben. Zwar verringert die Konjugation von Cy3 an den Antisense Stranges den RNA-Interferenzeffekt (Daten nicht gezeigt), aber an dieser Stelle sollte lediglich die Aufnahme der siRNAs in die Zelle gezeigt werden, da eine Aktivität der Konjugate bereits an anderer Stelle beschrieben wurde (Kapitel 3.3.4). 24 h nach der Zugabe der siRNA wurde das Medium von den Zellen abgenommen und gegen frisches Vollmedium ersetzt, um die Inkubationsansätze mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Anhand einer nachfolgenden Färbung mit dem DNA-Interkalationsfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) konnte der Zellkern identifiziert und durch Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen die Cy3-Rotfluoreszenz dem Zytoplasma zugeordnet werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Aufnahmestudien sind in Abbildung 3.34 zusammengefasst.

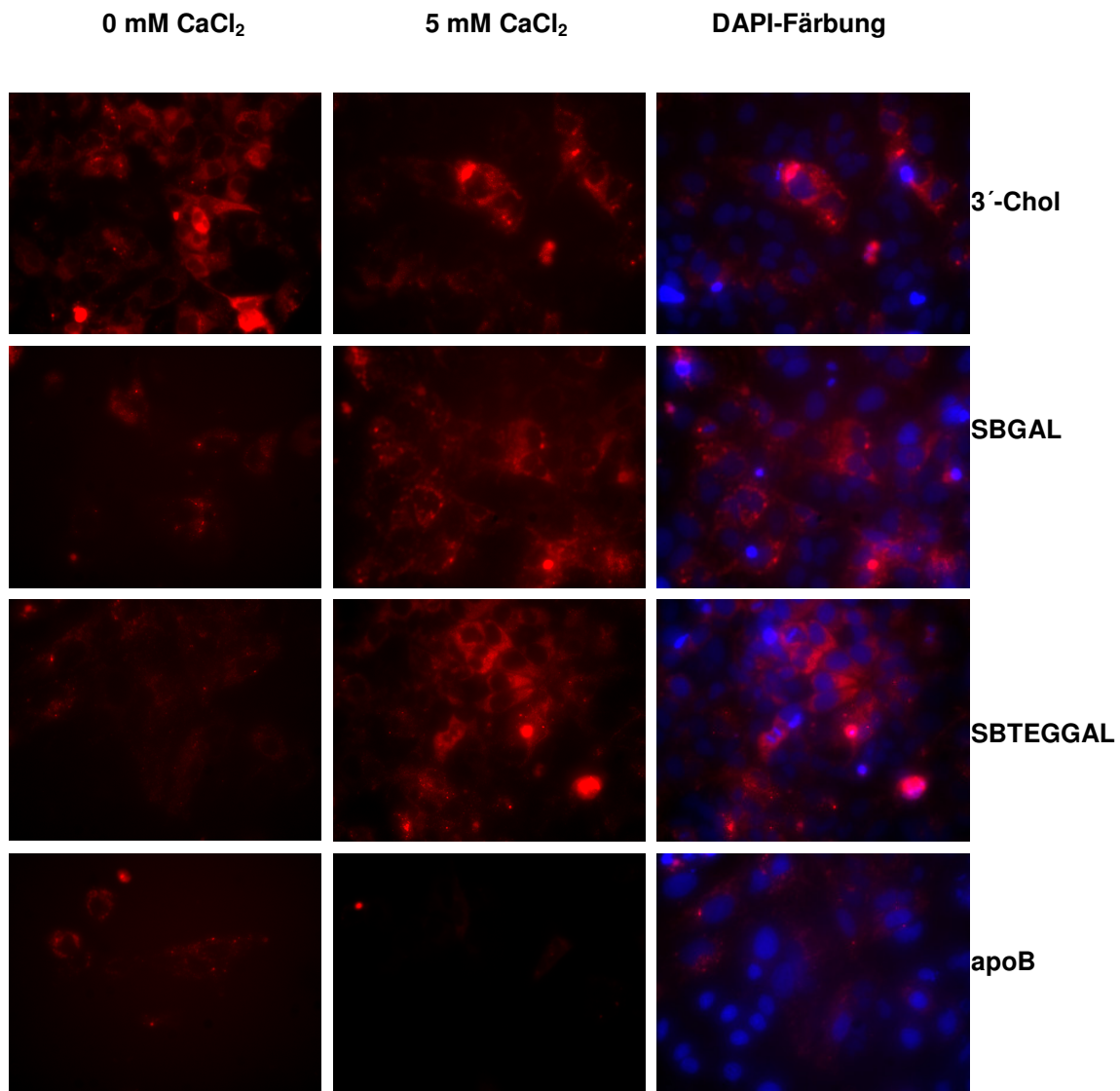


Abbildung 3.34: Fluoreszenzaufnahmen der Inkubation mit Cy3-markierter siRNA in einer Endkonzentration von 10 μM nach Zellanzucht der humanen HuH7 Zellen in 0 mM und 5 mM CaCl_2 und anschließender DAPI Kernfärbung für 3'-Chol-, SBGAL- und SBTEGGAL-Konjugate sowie die unmodifizierte spezifische apoB Sequenz.

Bei den Zellen, die mit Galaktose-modifizierten siRNAs inkubiert wurden, konnte ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Bei Zellanzucht ohne Kalziumchlorid war nur eine geringe Rotfluoreszenz in den Zellen detektierbar, während bei einem Zellwachstum in 5 mM Kalziumchlorid eine erhebliche Steigerung der Fluoreszenz in den Zellen erreicht werden konnte. Mit Hilfe einer DAPI-Färbung konnte der Zellkern identifiziert und durch Überlagerung der Rot- und Blaufluoreszenz die Cy3 Fluoreszenz dem Zytoplasma zugeordnet werden (Abb. 3.34).

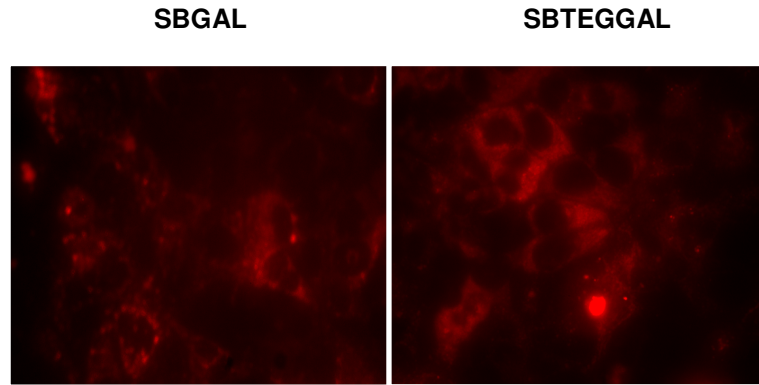


Abbildung 3.35: Vergrößerung eines Ausschnitts der Fluoreszenzaufnahmen der humanen HuH7 Zellen nach Inkubation mit Cy3 markierter siRNA (10 μ M) und Zellanzucht in 5 mM CaCl_2 für die SBGAL- und SBTEGGAL-Konjugate.

Es zeigt sich sogar ein Unterschied in der Fluoreszenzverteilung der einzelnen Ansätze innerhalb des Zytoplasmas. So war bei der Inkubation mit der SBTEGGAL-modifizierten siRNA eine gleichmäßige, konstante Verteilung der siRNA im gesamten Zytoplasma sichtbar, während die SBGAL-konjugierte siRNA nur in bestimmten Bereichen akkumulierte.

3.3.6 Wettbewerbsstudien mit *N*-Acetylgalaktosamin

Da für die Aufnahme in das Zytoplasma für die Galaktose-konjugierten siRNAs eine Internalisierung über den Ashwell-Rezeptor (ASGPR) postuliert wurde, sollte bei Zusatz eines stärkeren Liganden des Rezeptors diese Aufnahme inhibiert werden. Laut Literatur besitzt *N*-Acetylgalaktosamin eine 40-fach höhere Affinität für den ASGPR als Galaktose (Biessen et al., 1994g) und wurde daher für die folgenden Wettbewerbsstudien ausgewählt.

Dafür wurden die Zellen vor Zugabe der siRNA 30 min mit 1 mM *N*-Acetylgalaktosamin inkubiert, die siRNA in Endkonzentrationen von 10 μ M, 5 μ M und 1 μ M zugegeben und anschließend der Protein- und m-RNA Gehalt bestimmt, wie bereits in Kapitel 3.3.4. beschrieben. Die graphische Darstellung der Wettbewerbsexperimente findet sich in Abbildung 3.36 A und B. Des Weiteren konnte durch Ermittlung der P-Werte für die 3'-Chol Modifikation wieder die Signifikanz der erhaltenen Werte bestätigt werden.

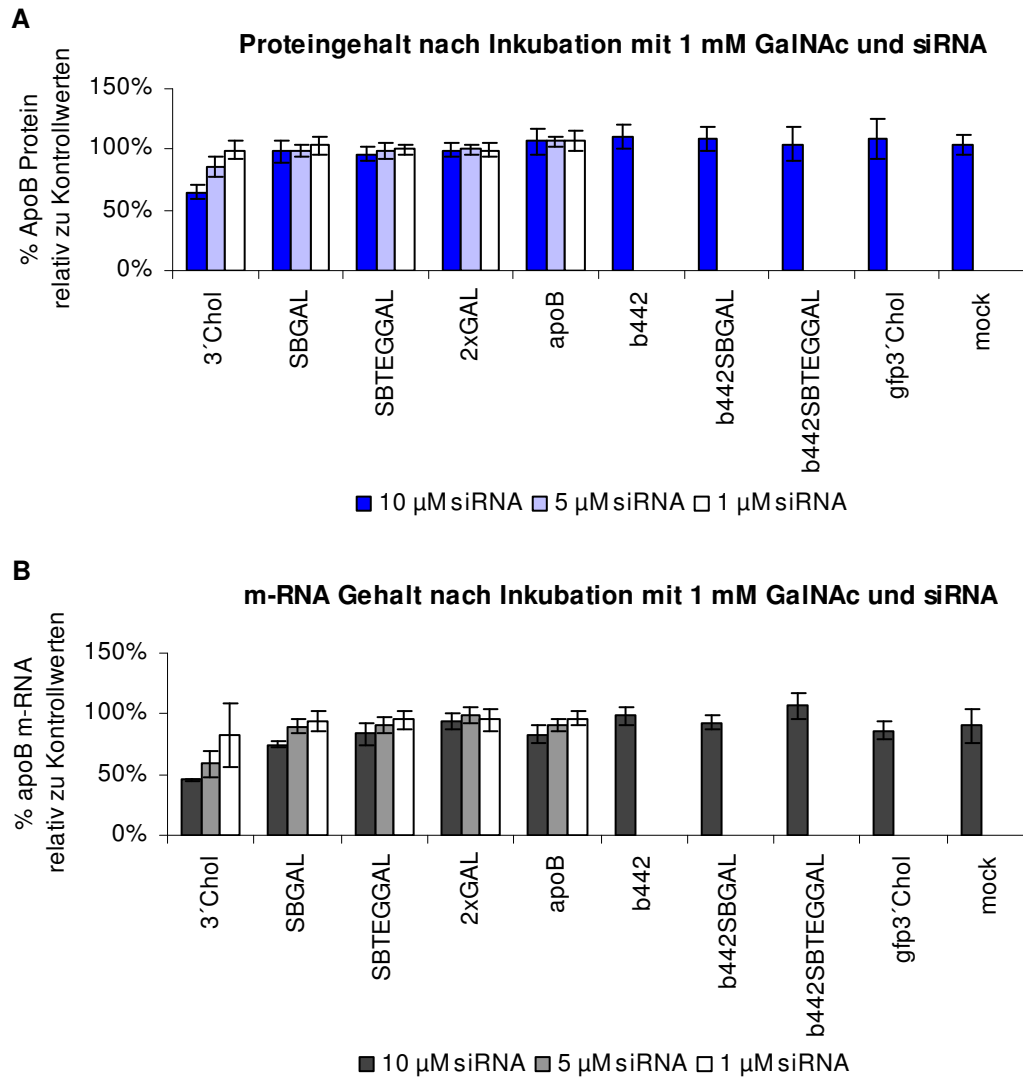


Abbildung 3.36: Gezeigt ist der Protein- (A) und m-RNA Gehalt (B) nach Kompetition mit 1 mM GalNAc und anschließender siRNA Zugabe (10 μ M, 5 μ M und 1 μ M) bei Zellanzucht der humanen HuH7 Zellen in 5 mM CaCl_2 , bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen b442, b442SBGAL, b442SBTEGGAL und gfp 3'-Chol ($P < 0,05$ für 10 μ M siRNA).

Durch die Inkubation der Zellen mit *N*-Acetylgalaktosamin und anschließender Zugabe der siRNA, ließ sich der in Abschnitt 3.3.4 gezeigte Interferenzeffekt der Zucker-konjugierten siRNAs fast vollständig unterdrücken. Bis auf die 3'-Chol modifizierte Sequenz war keine der getesteten siRNA mehr in der Lage, eine deutliche Reduktion von ApoB auf Protein- oder m-RNA Ebene zu bewirken (Abb. 3.36).

3.3.7 Einfluss der Modifikation auf die Zytotoxizität

Eine weitere wichtige Anforderung an biologisch wirksame Substanzen ist eine geringe Zytotoxizität. Diese äußert sich meist in einer Schädigung der Zellmembran, die dadurch ihre Integrität verliert. Wird die Membran geschädigt, gelangen zytosolische Substanzen und Proteine in den extrazellulären Raum. Eines dieser Proteine ist die Laktatdehydrogenase, deren Freisetzung bei der verwendeten Nachweismethode ausgenutzt wurde (CytoToxONE, Promega). Als Positivkontrolle wurden Zellen mit einer Triton X-100 Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.3.1.7). In Abbildung 3.37 sind die Ergebnisse graphisch zusammengestellt.

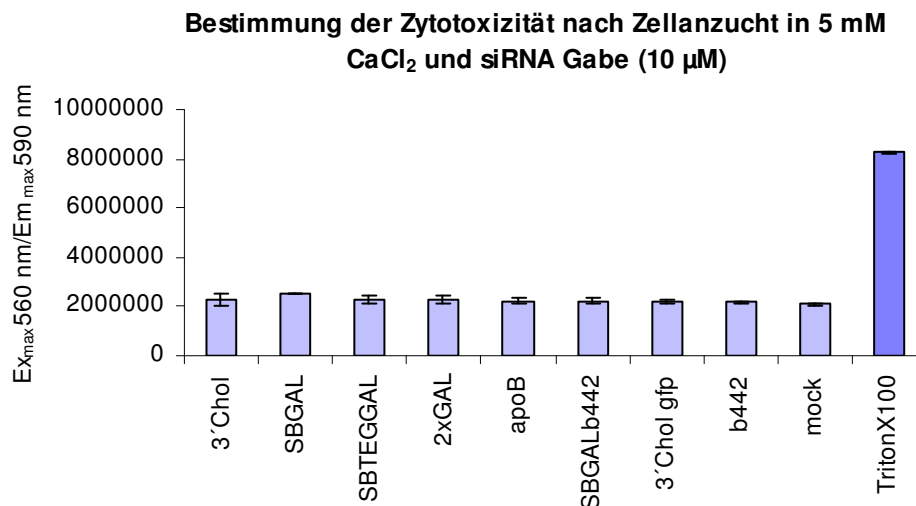


Abbildung 3.37: Graphische Zusammenstellung der ermittelten Zytotoxizitäten (Ex_{max} 560 nm/ Em_{max} 590 nm) der verschieden modifizierten siRNAs, der apoB Sequenz sowie der Negativkontrollen und des mock-Ansatzes für die humane Zelllinie HuH7 als Mittelwert einer Dreifachbestimmung (hellblau). Ebenfalls gezeigt ist die gemessene Fluoreszenz der Positivkontrolle (0,1 M Triton X-100, dunkelblau).

Anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Abb. 3.37) konnten keine zytotoxischen Eigenschaften einer siRNA beobachtet werden. Auch die Zellanzucht in 5 mM Kalziumchlorid hatte keine toxischen Effekte zur Folge. Alle Werte lagen im Bereich des mock-Ansatzes, der keine siRNA enthielt.

3.4 Analyse der siRNAs in einer Rattenleberkarzinomzelllinie

Alle bisherigen Untersuchungen der posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression wurden in humanen Leberkarzinomzellen durchgeführt. Doch im Hinblick auf einen möglichen Tierversuch und zur Darlegung, dass sich die

erhaltenen Interferenzeffekte nicht nur auf eine Zelllinie beziehen, wurden einige Experimente in Rattenleberkarzinomzellen wiederholt. Hierzu wurden verschiedene Zelllinien hinsichtlich ihrer *apoB* Expression getestet und gleichzeitig die optimale Zellzahl/Ansatz ermittelt. Anhand dieser Voruntersuchungen wurde die von Buffalo Ratten abgeleitete Hepatokarzinomzelllinie MH7777A mit einer Zellzahl von 10000 Zellen/Ansatz für die weiteren Experimente ausgewählt.

3.4.1 Posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression *in vitro* durch Transfektion und Aufzeigen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung

Da die verwendeten siRNAs eine Kreuzreaktivität mit der in Ratten exprimierten *apoB* m-RNA aufwiesen, konnte eine Aktivität hinsichtlich der posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression erwartet werden. Jedoch musste diese Annahme durch Transfektion bewiesen und zudem gleichzeitig eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufgezeigt werden. So wurde, wie bereits für die humane Zelllinie HuH7 beschrieben, die siRNA in Konzentrationen von 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM mit Hilfe von Oligofectamine als Transfektionsreagenz in die Zellen eingebracht und die inhibitorischen Effekte auf m-RNA Ebene nachgewiesen. Auf den indirekten Nachweis des Interferenzeffekts auf Proteinebene wurde bei diesen Experimenten verzichtet, da der direkte Nachweis der m-RNA als ausreichend angesehen wurde. Die Reduktion der m-RNA konnte wieder als Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit je einer Dreifachbestimmung bezogen auf den Mittelwert aller Negativkontrollen dargestellt werden. In Abbildung 3.38 sind die erhaltenen Ergebnisse der Transfektion graphisch aufgeführt.

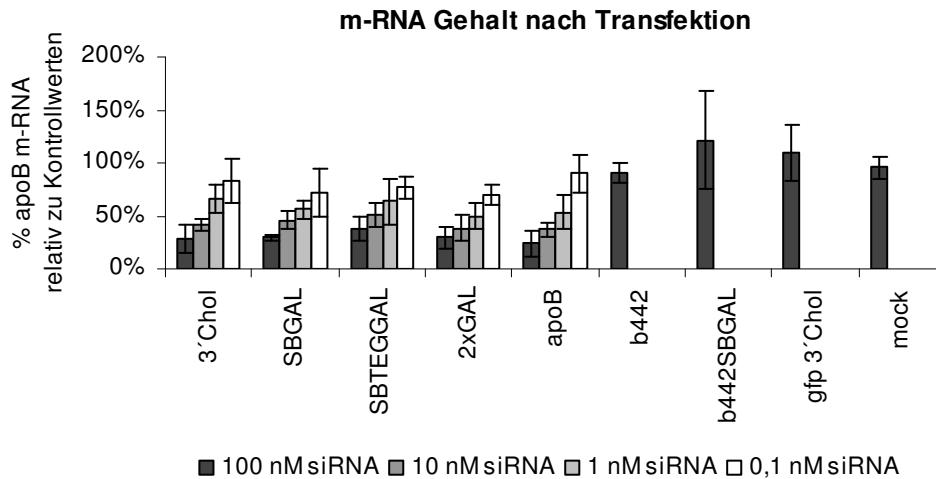


Abbildung 3.38: Gezeigt ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung der inhibitorischen Effekte von 3'-Chol- und GAL-konjugierten siRNAs sowie der unmodifizierten Sequenz apoB nach Transfektion mit 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM siRNA auf m-RNA Ebene in den Rattenzellen MH7777A, bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen b442, b442SBGAL und gfp 3'-Chol. Anhand der mit dem Studentischen T-Test ermittelten Werte ($P < 0,01$) wurde von einer Signifikanz der erhaltenen Reduktionen bei 10 μ M siRNA Konzentration ausgegangen.

Die graphische Darstellung des m-RNA Gehalts im Anschluss an die Transfektion zeigt eine dosisabhängige Reduktion der *apoB* m-RNA bei allen Konjugaten im Vergleich zum Mittelwert aller Negativkontrollen (100% *apoB* m-RNA). So ließ sich ein inhibitorischer Effekt von etwa 70% bei allen modifizierten siRNAs in der höchsten Konzentration nachweisen, während die unmodifizierte apoB Sequenz eine Reduktion von *apoB* um 80% bewirkte. Selbst in der geringsten Konzentration von 0,1 nM siRNA war mit dem SBGAL- und dem 2xGAL-Konjugat noch eine 30%ige Abnahme der m-RNA zu beobachten. Die Negativkontrollen sowie der mock-Ansatz waren, wie gewünscht, nicht in der Lage, einen inhibitorischen Effekt auszulösen.

3.4.2 Posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression *in vitro* ohne Transfektionshilfe und Aufzeigen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung

Rattenleberkarzinomzellen exprimieren ebenfalls den Asialoglykoprotein-Rezeptor (Weigel, 1980b; Halberg et al., 1987b), so dass eine Aufnahme der Zucker-konjugierten siRNAs in das Zellinnere möglich sein sollte. Anhand der Inkubationsexperimente ohne Transfektionshilfe sollte diese Aussage mit drei Konzentrationen an siRNA (10 μ M, 5 μ M und 1 μ M) bewiesen werden und die

dosisabhängigen inhibitorischen Effekte relativ zu dem Mittelwert der Negativkontrollen gezeigt werden (Abb. 3.39).

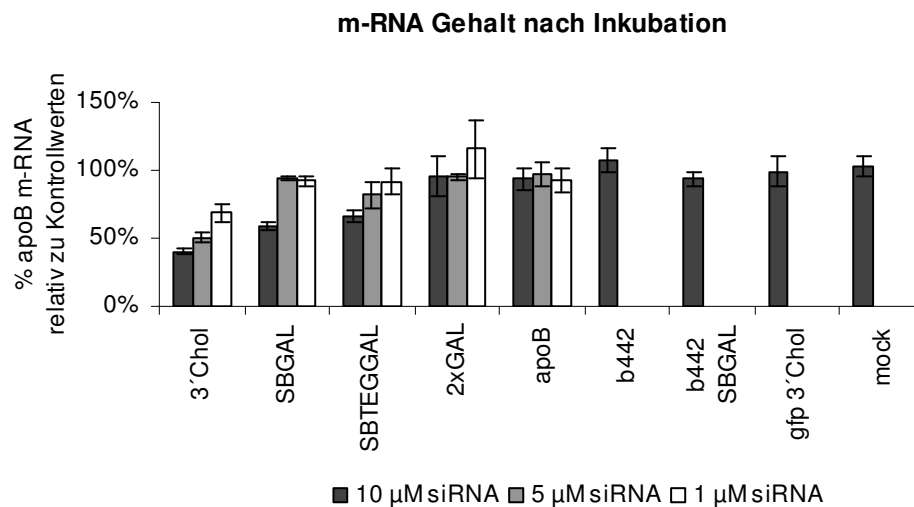


Abbildung 3.39: Zusammenfassung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der inhibitorischen Effekte 3'-Chol- und Zucker-konjugierter siRNAs sowie der unmodifizierten apoB Sequenz in den Rattenzellen MH7777A nach Inkubation mit 10 µM, 5 µM und 1 µM siRNA auf m-RNA Ebene bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen b442, b442SBGAL und gfp 3'-Chol. Der Studentische T-Test lieferte Werte $P < 0,01$ für siRNA Konzentrationen von 10 µM.

Bei Inkubation der Zellen mit siRNA ohne Transfektionshilfe ließ sich eine Reduktion von *apoB* mit den verzweigten Galaktose-Molekülen zeigen, welche in der höchsten Konzentration bis zu 40% mit der SBGAL-modifizierten siRNA betrug, bezogen auf 100% *apoB* m-RNA Gehalt der Negativkontrollen. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte jedoch nur für das SBTEGGAL-Konjugat gezeigt werden. Eine Reduktion der *apoB* m-RNA von etwa 60% konnte mit dem 3'-Chol-Konjugat in höchster Konzentration nachgewiesen werden. Die linear konjugierte siRNA 2xGAL sowie die unmodifizierte apoB Sequenz konnten keine Reduktion von *apoB* bewirken. Ebenso war keine Aktivität der Negativkontrollen zu beobachten.

3.4.3 Analyse einer Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Rezeptoraktivierung

Wie schon für die humanen Zelllinien beschrieben (Kapitel 3.3.4), wurden die Zellen zwei Tage vor dem Inkubationsexperiment in 5 mM Kalziumchlorid angezogen, um den ASGPR zu stimulieren. Im Anschluss wurde die siRNA in Konzentrationen von 10 µM, 5 µM und 1 µM zugesetzt und nach 48h der Gehalt an m-RNA in den Zellen

bestimmt, indem die gemessenen Werte auf den Mittelwert aller Negativkontrollen normiert wurden. Abbildung 3.40 gibt die Ergebnisse graphisch wieder.

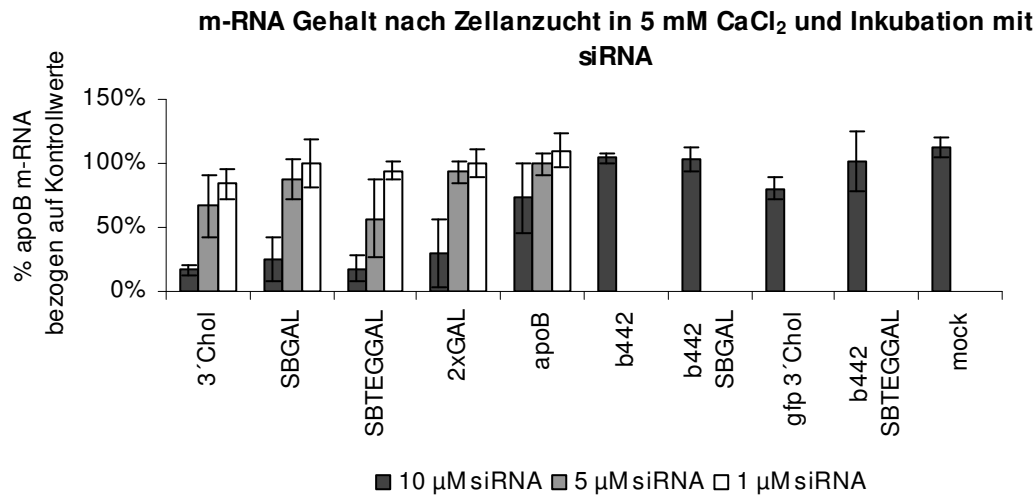


Abbildung 3.40: Graphische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Interferenzeffekte 3'-Chol- und Zucker-konjugierter siRNAs sowie der unmodifizierten apoB Sequenz in den Rattenzellen MH7777A nach Inkubation mit 10 µM, 5 µM und 1 µM siRNA auf m-RNA Ebene bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen b442, b442SBGAL, b442SBTEGGAL und gfp 3'-Chol nach vorheriger Zellanzucht in 5 mM CaCl₂ ($P < 0,01$ für modifizierte siRNAs 10 µM).

Nach Zellanzucht in 5 mM Kalziumchlorid konnte auch für die Rattenzelllinie eine starke Erhöhung der Interferenzeffekte der GAL-konjugierten siRNAs nachgewiesen werden. So ließ sich der Gehalt an *apoB* m-RNA mit der SBTEGGAL-konjugierten siRNA in höchster Konzentration bis auf 18% senken, während das SBGAL Konjugat eine Restexpression von 25% bewirkte. Durch die Berechnung der P-Werte ($P < 0,01$) der höchsten eingesetzten Konzentrationen konnte von einer Signifikanz der erhaltenen Werte ausgegangen werden. Auch das linear konjugierte Molekül war in der Lage, einen inhibitorischen Effekt von 70% auszulösen, allerdings war die Standardabweichung bei diesem Konjugat sehr hoch. Anzumerken ist hier noch ein geringer Effekt der unkonguierten apoB Sequenz von ca. 15%, der jedoch im Bereich der Fehlertoleranz lag.

3.4.4 Kompetitionsstudien mit *N*-Acetylgalaktosamin

Da durch Zusatz von Kalziumchlorid die Interferenzeffekte der GAL-konjugierten siRNAs gesteigert werden konnten (Kapitel 3.4.3), ist eine Aufnahme über den ASGPR anzunehmen. Dies bedeutet, dass durch Zusatz des Kompetitors *N*-

Acetylgalaktosamin eine Bindung und Internalisierung der Zucker-modifizierten Moleküle inhibiert werden sollte und somit keine Reduktion der m-RNA zu beobachten sein dürfte. So wurden die Zellen vor siRNA Zugabe mit 1 mM *N*-Acetylgalaktosamin inkubiert und nach 48h der m-RNA Gehalt der Zellen, wie bereits beschrieben, ermittelt. In Abbildung 3.41 ist der Gehalt an m-RNA für unterschiedlich konzentrierte siRNAs graphisch dargestellt.

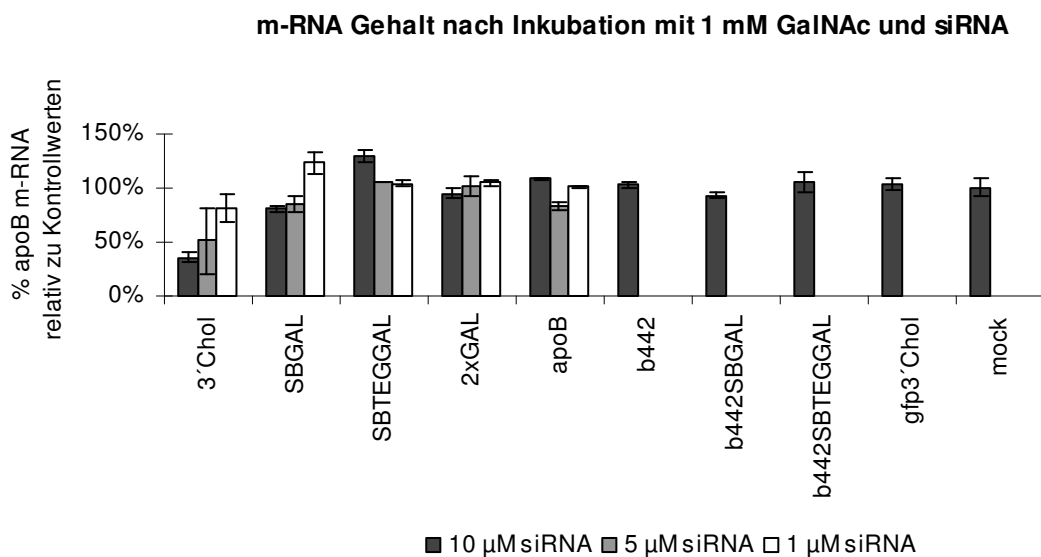


Abbildung 3.41: Gezeigt ist der m-RNA Gehalt nach Competition mit 1 mM GalNAc und anschließender siRNA Zugabe (10 µM, 5 µM und 1 µM) bei Zellanzucht der MH7777A Zellen in 5 mM CaCl₂, bezogen auf den Mittelwert der Negativkontrollen b442, b442SBGAL, b442SBTEGGAL und gfp 3'-Chol. Der Studentische T-Test ergab eine Signifikanz der erhaltenen Werte ($P < 0,05$ für 10 µM siRNA).

Durch Inkubation der Zellen mit *N*-Acetylgalaktosamin vor siRNA Zugabe, ließen sich die gezeigten Interferenzeffekte der Galaktose-Konjugate fast vollständig inhibieren. Nur die SBGAL-modifizierte Sequenz zeigte noch eine geringe Reduktion der m-RNA von ca. 20% in der höchsten eingesetzten Konzentration. Der Effekt der 3'-Chol konjugierten siRNA hingegen blieb von der Inkubation mit GalNAc unbeeinflusst und bewirkte bei einer Dosis von 10 µM eine Reduktion der m-RNA um 65%.

3.4.5 Einfluss der Modifikation auf die Zytotoxizität

Wie bereits für die humane Leberkarzinomzelllinie beschrieben (Kapitel 3.3.7), sollte abschließend auch über die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) die

Zytotoxizität der siRNAs für die Rattenleberkarzinomzelllinie bestimmt werden. Dazu wurden die Zellüberstände nach Zellanzucht in 5 mM Kalziumchlorid und Inkubation mit 10 μ M siRNA hinsichtlich des Laktatdehydrogenase-Gehalts untersucht. In Abbildung 3.42 sind die gemessenen Werte graphisch zusammengefasst.

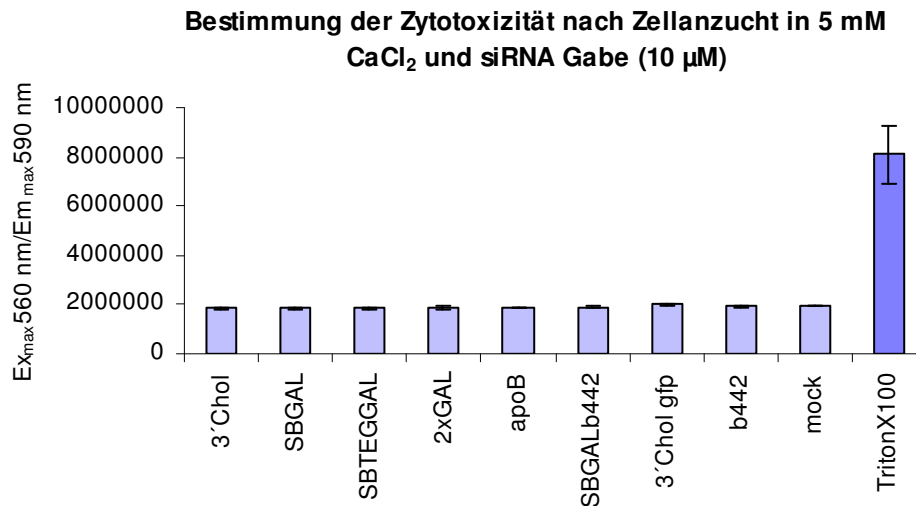


Abbildung 3.42: Graphische Darstellung der ermittelten Zytotoxizitäten ($\text{Ex}_{\text{max}} 560 \text{ nm} / \text{Em}_{\text{max}} 590 \text{ nm}$) der verschiedenen modifizierten siRNAs, der apoB Sequenz sowie der Negativkontrollen und des mock-Ansatzes für die Rattenzelllinie MH7777A als Mittelwert einer Dreifachbestimmung. Ebenfalls gezeigt ist die gemessene Fluoreszenz der Positivkontrolle (0,1 M Triton X-100).

Anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten konnten auch hier keine zytotoxischen Eigenschaften der siRNAs und der Inkubation in 5 mM Kalziumchlorid festgestellt werden (siehe Abb. 3.42).

3.5 Nachweis des Asialoglykoprotein-Rezeptors

Da von einer Bindung und Internalisierung der Galaktose-konjugierten siRNAs über den ASGPR ausgegangen wurde, sollte dieser zur Vollständigkeit auch in humanen und Rattenleberkarzinomzellen mittels Western-Blot Analyse nachgewiesen werden. Weiterhin wurde versucht, einen eventuellen Unterschied in der Proteinexpression von Zellen darzulegen, die in 0 mM und 5 mM Kalziumchlorid angezogen wurden. Dazu wurden von beiden Zelllinien 40 μ g Gesamtprotein verwendet. Abbildung 3.43 zeigt das erhaltene Luminogramm.

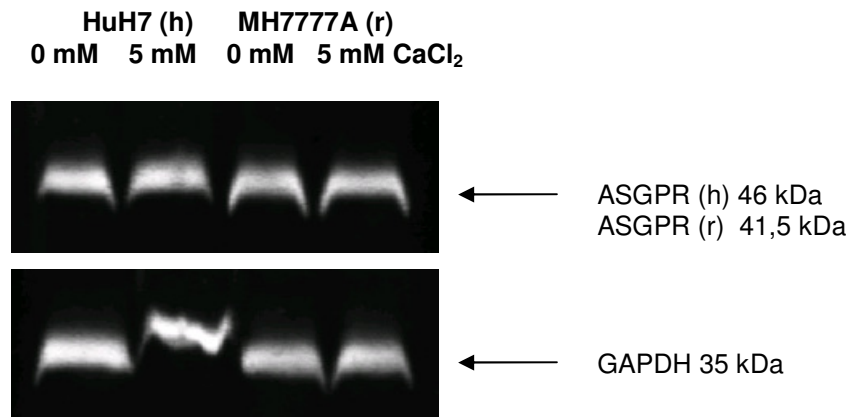


Abbildung 3.43: Luminogramm der Western-Blot Analyse mit 40 µg Protein der HuH7 (0 mM und 5 mM CaCl₂) und MH7777A (0 mM und 5 mM CaCl₂) Gesamtzelllysate unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen den ASGPR in humanen (46 kDa) und Rattenleberzellen (41,5 kDa) sowie GAPDH (35 kDa) als Ladungskontrolle.

Durch immunologischen Nachweis ließ sich der Asialoglykoprotein-Rezeptor in beiden Zelllinien mit spezifischen Antikörpern detektieren. So konnte der humane ASGPR mit einer Größe von 46 kDa und der in Ratten exprimierte ASGPR mit 41,5 kDa im Luminogramm sichtbar gemacht werden. Anhand des Luminogramms konnten keine Unterschiede in der Proteinexpression zwischen der Zellanzucht in 0 mM und 5 mM Kalziumchlorid nachgewiesen werden. Das Kalziumchlorid hatte demnach keine Auswirkungen auf die Proteinexpression (Kapitel 4.5).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Aufnahme von siRNAs als potentielle Inhibitoren der ApoB Expression in humane Hepatozyten über drei verschiedene Strategien zu ermöglichen. Im ersten Ansatz sollte durch die Modifikation der negativ geladenen siRNA-Moleküle mit hydrophoben Steroid-Derivaten eine Annäherung an die lipophile Zellmembran erleichtert bzw. eine Permeation oder eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme ermöglicht werden (Manoharan, 2002; Lorenz et al., 2004; Soutschek et al., 2004; Bijsterbosch et al., 2002). Ein zweiter Ansatz zur Permeation der Zellmembran stellte die Konjugation von Amininen, Aminosäuren und Dipeptiden dar. So wurde zum einen auch hier die Lipophilie der siRNAs erhöht und zum anderen die Möglichkeit einer unspezifischen Zellpenetration oder einer definierten Aufnahme über Aminosäurekanäle und Nährstofftransporter geschaffen (Antopolsky et al., 1999; Astriab-Fisher et al., 2000; Manoharan, 2002; Rogers et al., 2004). Die Glykokonjugation zur Rezeptor-vermittelten Aufnahme über den Asialoglykoprotein-Rezeptor stellte den dritten Ansatz dar und wurde bereits in der Antisense-Forschung erfolgreich eingesetzt (Biessen et al., 2000; Biessen et al., 1999; Biessen et al., 1994). Vor diesem Hintergrund sollte die Konjugation verschiedener Galaktose-Modifikationen an die siRNA eine Internalisierung in das Zytoplasma ermöglichen. Bei allen hier synthetisierten siRNAs sollte durch die Konjugation der verschiedenen Moleküle jedoch nicht die Aktivität hinsichtlich des RNA-Interferenzeffekts verloren gehen. Daher wurden alle siRNA-Konjugate zunächst in Transfektionsexperimenten untersucht, bevor sie in Inkubationsexperimenten ohne Transfektionshilfe eingesetzt wurden.

4.1 Vergleich der Organisch chemischen Syntheseverfahren

Da die synthetisierten Verbindungen am 5'-Ende des Sense Stranges eingeführt werden sollten, bot sich eine Kopplung direkt im Anschluss an die RNA-Festphasensynthese an. Dazu mussten die hergestellten Verbindungen entsprechend modifiziert werden. Analog zu den Standard-Amiditen für die RNA-Synthese wurde eine Phosphoramidit-Gruppe im letzten Syntheseschritt an einer freien Hydroxyl-Funktion eingebracht, um die Kopplung an die RNA zu ermöglichen.

Für die Überführung von Lithocholsäure **1** in das entsprechende Säureamid **2** wurden die Synthesebedingungen von Lorenz et al. übernommen (Lorenz et al.,

2004). Allerdings wurde nicht in reinem Dichlormethan, sondern in einem 1:1 Gemisch aus Dichlormethan und *N,N* Dimethylformamid gearbeitet, da ansonsten der zugesetzte Aktivator (EDCI) nicht in Lösung gebracht werden konnte. Verbindung **2** wurde in einer Ausbeute von 47,7% erhalten. Im Anschluss wurde das Lithocholsäure-di-*n*-decylamid **2** an der freien Hydroxyl-Funktion phosphityliert und Verbindung **3** in einer Ausbeute von 72,9% gewonnen. Anzumerken ist, dass die Syntheseausbeute der Phosphitylierungsreaktion gegenüber der in der Literatur angegebenen Ausbeute um mehr als 20% gesteigert werden konnte (Lorenz et al., 2004). Über die eingeführte Phosphoramidit-Gruppe war schließlich die Kopplung von Verbindung **3** (Litho) an die RNA in der Festphasensynthese möglich.

Bei der Synthese von *N*-6-(Hydroxyhexyl)-carbamidsäurecholesterylester **5** durch die Umsetzung von Cholesteryl-chloroformiat **4** mit 6-Aminohexanol wurde das Produkt **6** in 82,4% Ausbeute erhalten. Bei der durchgeführten Reaktion konnte durch die gewählte Temperatur von 0 °C und das langsame Zutropfen von 6-Aminohexanol die Bildung des Säureamids gegenüber dem ebenfalls möglichen Ester begünstigt werden (Lorenz et al., 2004). Die anschließende Phosphitylierung wurde diesmal abweichend von Lorenz et al. durchgeführt. Es wurde anstelle von 2-Cyanoethyldiisopropylchlorophosphoramidit mit 2-Cyanoethyltetraisopropylphosphan als Phosphitylierungsreagenz gearbeitet (MacKellar et al., 1992). Allerdings lieferte die Einführung der Phosphoramidit-Gruppe an der primären Hydroxyl-Funktion (Verbindung **6**, Chol) eine schlechtere Syntheseausbeute von 58% verglichen mit der Phosphitylierung der sekundären Hydroxyl-Funktion von Verbindung **2** mit 73%.

Das Lupan-Derivat Betulin besitzt sowohl eine primäre Hydroxyl-Funktion an Position 28, als auch eine sekundäre an Position 3 des Steroid-Gerüsts. Durch den Umsatz von Verbindung **7** mit 4,4'-Dimethoxytriphenylchlormethan wurde der Tritylether **8** an der primären Hydroxyl-Funktion in einer Ausbeute von 64,2% erhalten (MacKellar et al., 1992). Durch die Phosphitylierung der sekundären Hydroxyl-Funktion an Position 3 wurde Verbindung **9** mit 33,5%iger Ausbeute erhalten. Im Vergleich konnte Verbindung **8** mit einer schlechteren Ausbeute phosphityliert werden als das für Verbindung **2** der Fall war, obwohl die Einführung der Amidit-Gruppe an der selben Position des Ringsystems erfolgte.

Die Glykosid-Synthese ist eine weit verbreitete Reaktion in der Natur und liefert eine Vielzahl an verschiedenen Oligosacchariden und Glykokonjugaten. Die große strukturelle Varianz und die Beteiligung solcher Strukturen an vielen biologischen Prozessen weckte das Interesse vieler Wissenschaftler, sie in therapeutische Ansätze einzubeziehen. Die Komplexität von Zuckerstrukturen erschwert allerdings auch ihre Synthese. In den letzten Jahren wurden einige Methoden zur Synthese und Verknüpfung dieser komplexen Strukturen mit einem Aglykon entwickelt, von denen zwei mögliche Ansätze auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Die generelle Strategie zur Knüpfung einer glykosidischen Bindung beinhaltet die Aktivierung des anomeren Zentrums und die anschließende Verknüpfung unter Einsatz eines Katalysators.

Für die Aktivierung des anomeren Zentrums stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Die erste Möglichkeit stellt die Aktivierung des anomeren Zentrums über einen direkten Sauerstoff-Austausch dar. Diese, auch als „Fischer-Helferich Reaktion“, bekannte Methode wurde in dieser Arbeit in Synthesestrategie A und B zur Herstellung des Galaktose-Amidits **18** verwendet (Schmidt und Kinzy, 1994). Als Ausgangsmaterial wurde β -D-Galaktosepentaacetat **12** eingesetzt und unter saurer Katalyse von BF_3 -Etherat das entsprechende Acetal gebildet (siehe Kapitel 3.1.5). Möglichkeit A lieferte unter Verwendung des Aglykons 4-*cis*-Benzyloxy-2-buten-1-ol Verbindung **13** mit einer Ausbeute von 68%, während in Möglichkeit B 4-Benzyloxy-1-butanol eingesetzt wurde, um das entsprechende Pyranosid **13a** zu synthetisieren. Dieses wurde ohne chromatographische Reinigung zur Deacetylierung eingesetzt. So konnten die Produkte **14** und **14a** mit Ausbeuten von 77,2% und 88,6% erhalten werden. Nach Tritylierung am C-6 OH der Galaktose und erneuter Peracetylierung wurde die Benzylschutzgruppe durch katalytische Hydrogenolyse entfernt und gleichzeitig die Doppelbindung des Pyranosids **16** hydriert. Als Katalysator stellte sich Palladium-Hydroxid auf Aktivkohle in Methanol als geeignet heraus, da mit anderen Katalysator-Systemen unvollständig entschützte Produkte entstanden. Synthesestrategie A lieferte das tritylierte Pyranosid **17** in einer Ausbeute von 71%, während Möglichkeit B Produkt **17** mit 46,5% Ausbeute hervorbrachte. Im Anschluss wurde die freie Hydroxyl-Funktion mit einer Phosphoramidit-Gruppe versehen und Verbindung **18** in Ausbeuten von 82% und 66% erhalten. Bei einer direkten Gegenüberstellung der Synthesemöglichkeiten A und B stellt Möglichkeit A, anhand der erzielten Ausbeuten, die bessere Variante zur Darstellung des tritylierten

Galaktose-Amidits **18** dar. Zudem ist die Verwendung von 4-*cis*-Benzyloxy-2-buten-1-ol als Aglykon aus Kostengründen zu empfehlen.

Eine modernere Möglichkeit zur Aktivierung des anomeren Zentrums ist die von R. R. Schmidt entwickelte Trichloracetimidat-Methode, bei der das Oxid am anomeren Zentrum erhalten bleibt (Schmidt und Kinzy, 1994). Dieses Verfahren, als Alternative zur „Anomeren O-Alkylierung“, wurde in dieser Arbeit als Synthesemöglichkeit C eingesetzt (siehe Abschnitt 3.5). Die Aktivierung des anomeren Zentrums beinhaltet eine einfache Basen-katalysierte Addition der Hydroxyl-Gruppe der Galaktose an Trichloracetonitril. Ausgehend von β -D-Galaktosepentaacetat **12** konnte das entsprechende O-Galaktosyl-trichloracetimidat **20** mit 71,5% Ausbeute erhalten werden. Der Vorteil hierbei ist, dass solche Imidate als stabile Zwischenprodukte isoliert werden können, da sie nicht hydrolyseempfindlich sind. Der anschließende Glykosylierungsschritt erfordert den katalytischen Einsatz einer Säure in Anwesenheit eines Glykosyl-Akzeptors und führt zur irreversiblen Bildung des gewünschten Pyranosids. In dieser Arbeit wurde unter Katalyse von Silber-Triflat und 4-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-oxy-1-butanol als Glykosyl-Akzeptor das TBS-geschützte β -Pyranosid **21** in einer Ausbeute von 78% synthetisiert. Um eine Bildung des korrespondierenden Orthoesters zu vermeiden, wurde diese Reaktion bei -78°C durchgeführt und der Alkohol langsam zur Reaktionslösung getropft (Yang et al., 2000). Nach Tritylierung der C6-OH Gruppe und anschließender Peracetylierung konnte der TBS-geschützte Tritylether **24** nach Säulenchromatographie erhalten werden. Die Abspaltung der TBS-Schutzgruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid lieferte Verbindung **17**, welche im Anschluss mit 74% Ausbeute zu Produkt **18** phosphoryliert werden konnte.

Ein Vergleich von Synthesemöglichkeit A und C liefert das gleiche Resultat für die Anknüpfung des Aglykons an das anomere Zentrum der Galaktose. In beiden Fällen wurde das entsprechende Pyranosid **13** und **21** in einer Ausbeute von ca. 77% erhalten. Jedoch war bei Strategie A auch die Bildung des α -Pyranosids zu etwa 10% zu beobachten, während in Strategie C selektiv das β -Anomere entstand. So muß der Schluss gezogen werden, dass unter den verwendeten Bedingungen die vorangegangene Umwandlung des β -D-Galaktosepentaacetats **12** in ein Trichloracetimidat **20** keine Notwendigkeit für die Alkylierung am anomeren Zentrum darstellt, jedoch so die Bildung des α -Pyranosids unterdrückt wurde.

4.2 Optimierung der RNA-Synthese mit modifizierten Synthonen

Die RNA-Festphasen-Synthese erfolgte mit den kommerziell erhältlichen 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)-Phosphoramiditen von Uridin, 4-*N*-tert-Butylphenoxyacetylcytidin, 6-*N*-tert-Butylphenoxyacetyladenin und 2-*N*-tert-Butylphenoxyacetylguanosin Monomeren nach einem Standard-Protokoll (Damha und Ogilvie, 1993). RNA-Stränge mit einem Phosphorothioat-Rückgrat, zur Erhöhung der Nukleaseresistenz, wurden durch Oxidation des Phosphits mit EDITH (3-Ethoxy-1,2,4-dithiazolin-5-on) eingeführt. Für die Einführung von 2'-O-Methylmodifikationen an der Ribose wurden entsprechend modifizierte, kommerziell erhältliche Nukleotide verwendet (Kapitel 2.2).

Die Anknüpfung der hergestellten Amidite Litho **3**, Chol **6**, Bet **9**, 3BChol **11** und Gal **18** (Kapitel 3.2) an das 5'-Ende des Sense Stranges erfolgte im letzten Zyklus der RNA-Festphasensynthese unter leicht modifizierten Kopplungsbedingungen. Eine Verlängerung der Kopplungszeiten sowie der Mengen an Aktivator und Amidit erwies sich hier als vorteilhaft (Kapitel 2.2.1). Für alle Amidite wurden die gleichen Kopplungsbedingungen verwendet, allerdings konnten unterschiedliche Kopplungseffizienzen beobachtet werden. Bei Amiditen, welche direkt am Steroid-Gerüst phosphityliert wurden, wie das Litho- **3**, das Bet- **9** und das 3BChol-Amidit **11**, konnten ähnliche Kopplungseffizienzen anhand der Rohausbeuten (OD₂₆₀/ml) und der tatsächlichen isolierten Ausbeuten (OD₂₆₀/ml) festgestellt werden (Kapitel 3.2.1). So war bei diesen Konjugaten eine Reinausbeute von etwa 25% nach Reinigung und Entsalzung im Vergleich zum Rohmaterial zu beobachten. Die Einführung eines zusätzlichen Linkers zwischen der RNA und dem 3BChol **11** (C12-3BChol) hatte keinen positiven Einfluss auf die erhaltene Reinausbeute. Bei Einsatz des verzweigten Linkers (SB) und zusätzlicher Einführung der Tetraethylenglykol-Gruppe (TEG), so dass die Konjugate SB3BChol und SBTEG3BChol entstanden, reduzierten sich die Kopplungseffizienten etwa um 30%. Die Anknüpfung des Chol-Amidits **6** lieferte in der Gruppe der Steroid-Modifikationen die geringsten Ausbeuten. So konnte bei der Synthese des SBChol-Konjugats nur das einfach konjugierte Produkt SB 1xChol mit einer Ausbeute von 2% isoliert werden. Das verzweigte Chol-Derivat ließ sich nicht gewinnen. Bei Einführung des Tetraethylenglykol-Linkers entstand sowohl das einfach konjugierte Produkt SBTEG 1xChol, als auch das doppelt modifizierte Konjugat SBTEG 2xChol. Allerdings entstand vorwiegend das einfach

konjugierte Material, das mit einer Ausbeute von 8% isoliert wurde. Eine mögliche Erklärung der schlechten Kopplungseffizienz des Chol-Amidits ist wahrscheinlich in der Struktur zu finden. So besitzt das Cholesterin, im Gegensatz zu den anderen verwendeten Steroid-Derivaten, im B-Ring des Steroid-Gerüsts eine Doppelbindung. Diese verringert die Flexibilität des Gesamtmoleküls und könnte zu einer sterischen Hinderung bei der Synthese führen. Für die Anknüpfung des Galaktose-Amidits **18** an die RNA (1xGAL und 2xGAL) konnten ähnliche Kopplungseffizienzen wie für die einfach gekoppelten Steroid-Amidite (**3**, **9** und **11**) beobachtet werden. Die Einführung des verzweigten Linkers führte zum SBGAL Konjugat, welches in einer Ausbeute von fast 60% erhalten wurde. Die zusätzliche Kopplung des Tetraethylenglykol-Linkers verringerte die Ausbeute um etwa 20%. Als Nebenprodukt dieser Synthese entstand das SBTEG-Konjugat, welches keine Zuckermodifikation trägt. Dieses wurde ebenfalls in die Reihe der Modifikationen aufgenommen, um einen eventuellen Effekt des Tetraethylenglykols selbst auszuschließen.

Die Kopplung von Aminen, Aminosäuren und Dipeptiden erfolgte erst im Anschluss an die Festphasensynthese. Hierzu wurde die RNA mit einem aktivierten *N*-Hydroxysuccinimid-Linker versehen und die zu konjugierenden Substanzen postsynthetisch mit Hilfe der „Spritzenmethode“ eingebracht, um eine stabile Amidbindung zu knüpfen (Kapitel 2.2.3). Das größte Hindernis bei dieser Methode stellte die Löslichkeit der Komponenten dar. So konnten alle Amine ohne Probleme in einem organischen Lösungsmittelgemisch aus 1 ml DCM/0,3 ml TEA gelöst und erfolgreich an die RNA gekoppelt werden. Bei den Dipeptiden Glycyl-L-Tyrosin und Glycyl-L-Phenylalanin musste ein protischeres Lösungsmittel gewählt werden. Die Knüpfung der Amidbindung wurde daher in einem Gemisch aus 0,8 ml MeOH/0,5 ml TEA durchgeführt. Alle anderen Aminosäuren und Dipeptide waren in organischen Lösungsmittelsystemen nicht in Lösung zu bringen, so dass auf ein wässriges System zurückgegriffen werden musste. Dies verringert allerdings die Aktivität und Stabilität des NHS-Esters, jedoch konnte keine andere Synthesestrategie erfolgreich verfolgt werden. So wurden das Arginin-, das Glycyl-L-Leucin- und das Carnosin-Konjugat mit Hilfe eines Borat-Puffersystems bei pH 8.5 hergestellt. Eine direkte Kopplungseffizienz kann allerdings bei diesen Konjugaten nicht bestimmt werden, da die Anknüpfung des NHS-Esters an die RNA während der Festphasensynthese ebenfalls einen limitierenden Faktor darstellt.

4.3 Eigenschaften der modifizierten siRNAs

4.3.1 Einfluss der siRNA-Modifikationen auf den RNA-Interferenzeffekt bei Transfektion

Um die *in vitro* Aktivität der modifizierten siRNAs zu ermitteln, wurden diese zunächst mit Hilfe eines Transfektionsreagenzes in die humanen HuH7 Zellen eingebracht. 48h nach Transfektion konnte anhand der ermittelten Restexpression von *apoB* das inhibitorische Potential der siRNAs hinsichtlich der posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression ermittelt werden. Hierzu wurde das sekretorische ApoB 100 Protein im Zellüberstand mittels ELISA und der *apoB* m-RNA Gehalt anhand der b-DNA Methode in den Zellen nachgewiesen. Der Mittelwert aller verwendeten Negativkontrollen wurde hierbei als 100% ApoB Protein- bzw. 100% *apoB* m-RNA Gehalt angenommen und alle erhaltenen Werte darauf bezogen. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da die Verwendung mehrerer unspezifischer siRNAs als Negativkontrollen gleiche Bedingungen bei der Durchführung der jeweiligen Experimente gewährleistet. Um dies zu ermöglichen wurden die Negativkontrollen in den gleichen Konzentrationen eingesetzt wie die zu untersuchenden Substanzen. Des Weiteren können so unspezifische Effekte der siRNAs auf die Genexpression ausgeschlossen werden.

Die in den Abbildungen 3.27 und 3.28 dargestellten Protein- und m-RNA Gehalte zeigen für alle modifizierten siRNAs, ausgenommen das C12-3BChol-Konjugat, die Fähigkeit zur posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression von *apoB*. Hierbei zeigt die unmodifizierte *apoB* Sequenz (Abb. 3.28, rosa) auf m-RNA Ebene bei Transfektion den größten inhibitorischen Effekt. Die Anknüpfung verschiedener Modifikationen an das 5'-Ende des Sense Stranges scheint in diesen Experimenten einen Einfluss auf die Aktivität der siRNA zu haben. So bewirkten alle modifizierten siRNAs eine geringere Abnahme des *apoB* m-RNA Gehalts verglichen mit der unmodifizierten Sequenz. Ob die eingeführten Modifikationen allerdings zu einer Störung des RNA-Interferenzmechanismus an sich führen oder ob es sich um eventuelle Wechselwirkungen mit dem Transfektionsreagenz handelt und folglich eine schlechtere Transfektionseffizienz, konnte nicht geklärt werden. Es ist allerdings anzunehmen, dass der Mechanismus durch die Modifikation nicht beeinflusst wird, da sich diese am 5'-Ende des Sense Stranges befinden, der laut veröffentlichten

Ergebnissen Modifikationen verschiedenster Art toleriert (Lorenz et al., 2004). Da laut siRNA Design der Antisense Strang in den RISC inkorporiert wird und mit der Ziel-m-RNA hybridisiert, sollte die 5'-Sense Modifikation keinen negativen Einfluss haben. Des Weiteren konnte in den nachfolgenden Inkubationsexperimenten ohne Transfektionsreagenz (Abb. 3.29 und 3.30) eine größere Aktivität verschiedener Konjugate beobachtet werden als bei den Transfektionsexperimenten. Somit ist eine Beeinflussung des RNA-Interferenzmechanismus durch die 5'-Sense Modifikation nicht anzunehmen.

Allgemein konnte eine größere Abnahme von *apoB* auf m-RNA Ebene (Abb. 3.28) als auf Proteinebene beobachtet werden (Abb. 3.27). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf den Zeitpunkt der Analyse zurückzuführen. Da es sich um eine posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression handelt, welcher den Abbau der entsprechenden m-RNA zur Folge hat, ist der Interferenz-Effekt natürlich zuerst auf m-RNA Ebene sichtbar. Zudem wurde der Nachweis des Proteingehalts zum gleichen Zeitpunkt geführt wie der Nachweis auf m-RNA Ebene. Würde man zu einem späteren Zeitpunkt den Gehalt von ApoB auf Protein- und m-RNA Ebene untersuchen, so ließen sich eventuell andere Ergebnisse finden. Nach etwa 72 h könnte der Effekt auf Proteinebene größer sein, da der Effekt auf m-RNA Ebene langsam nachlässt, aber die Auswirkungen auf die Translation immer noch messbar sind. Auf dieses Experiment wurde jedoch verzichtet, da eine Abnahme des m-RNA Gehalts als der relevante Parameter zum direkten Nachweis eines RNA-Interferenzeffekts angesehen wurde.

4.3.2 Einfluss der 5'-Sense Modifikation auf den RNA-Interferenzeffekt ohne Transfektionshilfe

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, siRNAs so zu modifizieren, dass diese eingeführten Modifikationen einen Transport in die Zelle ohne Transfektionshilfe ermöglichen und einen messbaren RNA-Interferenzeffekt auslösen. Daher wurden die modifizierten siRNAs mit einer humanen Leberkarzinomzelllinie inkubiert und wie unter Abschnitt 4.3.1 beschrieben, der Protein- und m-RNA Gehalt bestimmt. Anzumerken ist hier, dass die siRNAs 100-fach höher konzentriert eingesetzt wurden als in den Transfektionsexperimenten. Aus

Erfahrungswerten der Alnylam Europe AG bei der Inkubation modifizierter siRNAs mit humanen Zellen erwies sich eine Konzentration von 10 μ M als angemessen.

Zunächst lässt sich der bereits erwähnte Effekt der größeren Reduktion der m-RNA gegenüber dem Protein auch bei den Inkubationsexperimenten deutlich machen (Abb. 3.29 und 3.30). Mögliche Gründe hierfür wurden bereits in Abschnitt 4.3.1 diskutiert.

Darüber hinaus fällt auf, dass alle Cholesterin-konjugierten siRNAs (SB 1xChol, SBTEG 1xChol, SBTEG 2xChol und 3'-Chol) zumindest auf m-RNA Ebene (Abb. 3.29) eine größere Aktivität bei Inkubation zeigen als das für die Transfektion der Fall war (vgl. Abb. 3.28). So ließ sich beispielsweise mit dem 3'-Chol-Konjugat eine Abnahme des m-RNA Gehalts bei Inkubation um ca. 70% nachweisen (Abb. 3.30), während bei Transfektion nur eine Reduktion um 45% erzielt werden konnte (Abb. 3.28). Noch deutlicher wird dieser Effekt am Beispiel des C12-3BChol-Konjugats, welches bei Einsatz eines Transfektionsreagenzes keine Aktivität zeigte (Abb. 3.28), bei Inkubation allerdings eine Abnahme der m-RNA um 30% bewirkte (Abb. 3.30). Bei einigen Steroid-modifizierten siRNAs muß daher von einer Wechselwirkung mit dem Transfektionsreagenz ausgegangen werden, welche die Aktivität dieser Konjugate herabsetzt. Diese Hypothese könnte anhand von Elektroporationsexperimenten untermauert werden. Zusätzlich könnte auch die erhöhte siRNA Konzentration in den Inkubationsexperimenten für die stärkeren Interferenz-Effekte verantwortlich gemacht werden. Es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, wie viel siRNA tatsächlich in die Zelle aufgenommen wurde. Definitiv kann gesagt werden, dass die siRNAs in die Zelle aufgenommen wurden, da sie sonst keinen RNA-Interferenzeffekt auslösen könnten. Diese Ergebnisse gehen also konform mit bereits veröffentlichten Daten für Cholesterin-modifizierte siRNAs (Lorenz et al., 2004; Soutschek et al., 2004i). Allerdings wurden in dieser Arbeit erstmals verzweigte Cholesterin-Strukturen eingesetzt. Anhand des SBTEG 1xChol- und des SBTEG 2xChol-Konjugats (Abb. 3.29 und 3.30) konnte sowohl auf Protein- als auch auf m-RNA Ebene gezeigt werden, dass die Konjugation eines zweiten Cholesterin-Moleküls keinen zusätzlichen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt der siRNA hat. Es zeigte sich kein Unterschied in der Abnahme der m-RNA um 75% oder des Proteingehalts um 50% nach Inkubation mit beiden Konjugaten.

Aus der Gruppe der Zucker-modifizierten siRNAs bewirkte das SBTEGGAL-Konjugat eine Reduktion des Protein- und m-RNA Gehalts (Abb. 3.29 und 3.30). Das einfach (1xGAL) oder das linear konjugierte Molekül (2xGAL) hingegen zeigten keine Aktivität. Daher ist anzunehmen, dass das verzweigte Molekül SBTEGGAL in die Zelle aufgenommen wurde und die Konjugate mit nur einem terminalen Galaktose-Molekül nicht internalisiert wurden, da alle Konjugate bei Transfektion aktiv waren (Abb. 3.27 und 3.28). Anzumerken ist bei den unter Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Inkubationsexperimenten, dass die Amin-, Aminosäuren- und Dipeptid-konjugierten siRNAs sowohl auf Protein-, als auch auf m-RNA Ebene keine signifikante Abnahme von ApoB bewirken konnten. Die verwendeten Modifikationen scheinen offenbar nicht als Substrat für Aminosäure- oder Nährstoffkanäle zu dienen, oder aber die Lipophilie des Gesamtmoleküls war nicht ausreichend erhöht, um sich der lipophilen Zellmembran anzunähern. Wie erwartet, zeigt die unmodifizierte apoB Sequenz ebenfalls keine posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression von *apoB*, da davon ausgegangen wurde, dass diese auf Grund der intrinsischen physikochemischen Eigenschaften nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu überwinden.

4.3.3 Aufzeigen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung der modifizierten siRNAs bei Transfektion

4.3.3.1 Die siRNAs zeigen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung in der humanen Leberkarzinomzelllinie

Eine biologisch wirksame Substanz muß die Fähigkeit besitzen, in einer konzentrationsabhängigen Weise einen bestimmten Effekt auszulösen. Eine solche Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde auch in dieser Arbeit für einige siRNAs untersucht. Da in der Literatur bereits einige Beispiele für die Aktivität von Cholesterin-konjugierten siRNAs beschrieben sind (Lorenz et al., 2004; Soutschek et al., 2004), richtete sich das Augenmerk dieser Experimente auf die Gruppe der Zucker-modifizierten siRNAs.

Zunächst wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für transfizierte siRNAs aufgezeigt. Mit den eingesetzten Konzentrationen von 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM ließ sich für alle Zucker-Konjugate, das 3'-Chol-Konjugat und die unmodifizierte apoB

Sequenz eine Konzentrationsabhängigkeit der inhibitorischen Effekte auf Protein- und m-RNA Ebene nachweisen (Abb. 3.31 A und B). Auch hier konnte, bis auf die höchste eingesetzte Konzentration von 100 nM, eine größere Reduktion auf m-RNA Ebene als auf Protein-Ebene beobachtet werden. Dieser Effekt wurde bereits unter Abschnitt 4.3.1 diskutiert und ließ sich auch in diesen Experimenten bestätigen. Es lässt sich allerdings sagen, dass die Reduktion auf Protein- und m-RNA Ebene größer ist als bei den unter Abschnitt 4.3.1 diskutierten Transfektionsexperimenten (Abb. 3.27 und 3.28). Anhand der erhaltenen Daten ist bei den Dosis-Wirkungs-Experimenten (Abb. 3.31 A und B) von einer höheren Transfektionseffizienz auszugehen. Dies könnte der Verwendung einer neuen Charge von Oligofectamine zugeschrieben werden. So zeigte der Ansatz mit der unmodifizierten apoB Sequenz eine Restexpression von nur 20% in der höchsten Konzentration von 100 nM siRNA (Abb. 3.31 A), verglichen mit den vorher gezeigten Daten, bei der eine Reduktion bis auf 50% zu beobachten war (Abb. 3.27). Die Galaktose-modifizierten Sequenzen zeigten einen ähnlichen Effekt wie die unmodifizierte Sequenz, so dass hier keine negativen Einflüsse der 5'-Sense Modifikation anzunehmen sind. Selbst in der niedrigsten eingesetzten Konzentration konnte die Expression um 25% auf m-RNA Ebene (Abb. 3.31 B) durch die Zucker-konjugierten siRNAs reduziert werden, während die unmodifizierte Sequenz in dieser Konzentration keinen Effekt mehr zeigte.

4.3.3.2 Posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression mit den modifizierten siRNAs im Rattenzellsystem

Im Hinblick auf einen möglichen Tierversuch und zur Verifizierung der erhaltenen Daten mit der humanen Hepatozytenzelllinie, sollten die durchgeführten Experimente an einer weiteren Zelllinie wiederholt werden. Hierzu wurde eine Rattenleberkarzinomzelllinie gewählt. Auf den indirekten Nachweis der posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression auf Protein-Ebene wurde in diesen Experimenten verzichtet, da eine direkte Abnahme des m-RNA Gehalts als ausreichend angesehen wurde.

Da die in den bisherigen Experimenten eingesetzte siRNA-Sequenz eine Kreuzreaktivität mit der in Ratten exprimierten *apoB* m-RNA aufweist, wurde eine Aktivität hinsichtlich der posttranskriptionellen Hemmung der *apoB* Genexpression

angenommen. Jedoch sollte diese Annahme durch Transfektion bewiesen werden, bevor die synthetisierten Konjugate in Inkubationsexperimenten eingesetzt werden konnten. Gleichzeitig wurde versucht, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung als relevantes Kriterium einer biologisch aktiven Substanz für die verwendeten siRNAs aufzuzeigen. So wurde das gleiche Experiment, wie unter Abschnitt 4.3.3 diskutiert, in den Rattenhepatozyten durchgeführt. Auch hier konnte für die 3'-Chol-, die SBGAL- und die SBTEGGAL-modifizierte siRNA sowie für die unmodifizierte apoB siRNA eine Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden (Abb. 3.38). Verglichen mit den Daten der Transfektion in humanen Hepatozyten (Abschnitt 4.3.3, Abb. 3.31 B) zeigten sich die gleichen Ergebnisse. So war eine Abnahme der *apoB* m-RNA um 80% mit der unmodifizierten siRNA zu beobachten, genau wie zuvor für die humanen Zellen gezeigt. Auch hier konnten für die modifizierten Sequenzen ähnliche Aktivitäten wie für die unmodifizierte apoB Sequenz beobachtet werden, so dass die eingeführte 5'-Sense Modifikation nicht zu einer Beeinträchtigung des RNA-Interferenzmechanismus führt. Des Weiteren konnte ebenfalls eine gesteigerte Aktivität der Zucker-konjugierten siRNAs in der niedrigsten Konzentration von 0,1 nM siRNA gegenüber der unmodifizierten Sequenz deutlich gemacht werden. Diese bewirkte in der geringsten Konzentration eine Abnahme der *apoB* m-RNA um etwa 10%, während die 2xGAL- und SBGAL-konjugierte siRNA noch eine 30%ige Abnahme der m-RNA zeigten (Abb. 3.38). Für die humanen Hepatozyten konnten gleiche Ergebnisse erhalten werden (Abschnitt 4.3.3, Abb. 3.31 B). Es ist also gezeigt, dass die verwendeten siRNAs auch in Rattenhepatozyten aktiv sind und eine dosisabhängige posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression hervorrufen.

4.3.4 Die modifizierten siRNAs zeigen keine Hinweise auf Zytotoxizität im verwendeten Testsystem

Eine weitere wichtige Anforderung an eine biologisch wirksame Substanz ist eine geringe Zytotoxizität. Diese äußert sich meist in einer Schädigung der Zellmembran, welche dadurch ihre Integrität verliert. Wird die Membran geschädigt, gelangen zytosolische Substanzen und Proteine in den extrazellulären Raum. Eines dieser Proteine ist die Laktatdehydrogenase, deren Freisetzung bei dem hier verwendeten Testsystem ausgenutzt wurde (CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega). Sie katalysiert die Umsetzung von Laktat zu Pyruvat. Die dabei

freigesetzten Reduktionsäquivalente bewirken eine Reduktion des zugesetzten Substrats zu einem fluoreszierenden Molekül. Diese Fluoreszenz war mit Hilfe eines Fluorometers messbar und ist direkt proportional zur freigesetzten Menge an Laktatdehydrogenase und somit auch zur Menge geschädigter Zellen. Durch den Zusatz des nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 konnte die Schädigung der Zellmembran im durchgeführten Experiment simuliert werden, um eine Positivkontrolle zu erhalten. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Abb. 3.37 und 3.42) lagen alle im Bereich der mitgeführten mock-Kontrolle ohne siRNA. So kann davon vermutet werden, dass keine der modifizierten siRNAs zytotoxische Eigenschaften für humane oder Ratten-Hepatozyten *in vitro* besitzt. Dies stellt ein wichtiges Kriterium für die spätere therapeutische Anwendung solcher siRNAs in *in vivo* Experimenten dar. Die Konjugation der hier eingesetzten Zucker-Strukturen an eine siRNA stellt also kein Hindernis im Hinblick auf die Toxizität dar. Es konnte hiermit also ein Vorteil der direkten Konjugation von kleinen Molekülen gegenüber einer Formulierung mit Polyethylenimin- oder kationischen Lipid-Verpackungen und Transfektionsreagenzien deutlich gemacht werden, da diese Moleküle in verschiedenen Studien hohe Toxizitäten und unspezifische Effekte hervorriefen (Ma et al., 2005). Allerdings kann mit dieser verwendeten Methode keine generelle Aussage über die pharmakologischen Eigenschaften solcher siRNAs *in vivo* getroffen werden. Jedoch zeigte der hier verwendete Test keine Toxizität für das HuH7 und MH7777A Zellsystem und daher keine Schädigung der Zellmembran.

4.4 Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Galaktose-konjugierten siRNAs in Leberkarzinomzellen

4.4.1 Biochemische Hinweise

Ein erster Hinweis für die Aufnahme Galaktose-konjugierter siRNAs in die Zelle war bereits bei den in Abschnitt 4.3.2 diskutierten Inkubationsexperimenten ohne Transfektionshilfe zu finden (Abb. 3.30). Anhand der erhaltenen Daten (Abb. 3.32 A und B) konnte mit den verzweigten Galaktose-konjugierten siRNAs SBGAL und SBTEGGAL sowie der 3'-Chol modifizierten Sequenz eine Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden. Wie schon für die vorangegangenen Inkubationsexperimente (Abschnitt 4.2, Abb. 3.29 und 3.30) wurde hier ebenfalls ein inhibitorischer Effekt für das SBTEGGAL-Konjugat deutlich gemacht, welcher in der

höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μ M siRNA eine Reduktion von etwa 45% der *apoB* m-RNA Ebene bewirkte. Des Weiteren konnte auch für das SBGAL-Konjugat eine dosisabhängige Reduktion von *apoB* auf Protein- und m-RNA Ebene gezeigt werden. Es konnte mit diesem Konjugat auf Protein-Ebene eine Reduktion von ApoB um 40% erreicht werden, weshalb auch hier von einer Internalisierung der modifizierten siRNA ausgegangen wird. Für diese Aufnahme wurde eine Rezeptor-vermittelte Internalisierung über den Asialoglykoprotein-Rezeptor angenommen. Dieser wurde bereits mehrfach für die Aufnahme von Galaktose-konjugierten Molekülen beschrieben (Biessen et al., 1999; Biessen et al., 1994). Die unterschiedliche Präferenz dieses Rezeptors für terminale Galaktose-Strukturen (Rensen et al., 2001), liefert eine mögliche Erklärung für die fehlende Fähigkeit des 2xGAL-Konjugats RNA-Interferenz auszulösen. Zwar ließ sich auf Protein-Ebene (Abb. 3.32 A) eine geringfügige Reduktion von ApoB um etwa 25% in der höchsten Konzentration nachweisen, welche auf m-RNA Ebene allerdings nicht bestätigt werden konnte. Dieses Phänomen wurde bereits von anderen Gruppen beobachtet. So führte die Konjugation von verzweigten Galaktose-Strukturen zu einer erhöhten Aufnahme in Leberparenchymzellen (Biessen et al., 1994). Dieses später als „Cluster Effekt“ bezeichnete Phänomen scheint auf der Struktur des hier ausgenutzten Asialoglykoprotein-Rezeptors zu beruhen. Dieser erkennt seine Substrate über eine sogenannte „Carbohydrate Recognition Domain“, welche mehrere Bindungstaschen für Galaktose- und *N*-Acetylgalaktosamin-Reste besitzt (Lee und Lee, 1986; Hangeland et al., 1995; Duff et al., 2000). Die Bindung eines Zuckerrestes führt offenbar zu einem „Clustering“ des Rezeptors, so dass die Bindung eines zweiten Zuckerrestes erleichtert wird. Je mehr Reste am Rezeptor gebunden haben, desto stärker ist die Interaktion mit dem Substrat. Von Biessen und Kollegen konnte eine Präferenz des Asialoglykoprotein-Rezeptors ermittelt werden. So bindet ein terminaler Galaktoserest am schwächsten, während die Interaktion mit einem Molekül, welches vier terminale Gal-Reste besitzt, am stärksten ist (Rensen et al., 2001). Die detektierte Abnahme des ApoB Protein-Gehalts nach Inkubation mit der 2xGAL siRNA könnte auf eine verminderte Zellzahl in den entsprechenden Ansätzen hindeuten. Dies hätte einen geringeren Protein-Gehalt zur Folge. Dieser Effekt würde sich auf m-RNA Ebene nicht durchsetzen, da bei der Berechnung alle Werte auf die *gapdh* m-RNA normiert werden. Befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse weniger Zellen in den entsprechenden Ansatz, so würde auch der Gehalt an *gapdh* m-RNA

sinken. Bei der Normierung der *apoB* m-RNA auf die *gapdh* m-RNA gleicht sich so die geringere Zellzahl wieder aus. Es wird davon ausgegangen, dass die unmodifizierte apoB Sequenz ohne Transfektionshilfe nicht in die Zelle aufgenommen wird. Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen dieses Inkubationsexperiments (Abb. 3.32 A und B). Für keine der eingesetzten Konzentrationen konnte ein Interferenzeffekt auf Protein- oder m-RNA Ebene für die unmodifizierte Sequenz beobachtet werden. Ebenso waren keine unspezifischen Effekte der eingesetzten Negativkontrollen zu verzeichnen.

Weiterhin ist anzumerken, dass die in den Rattenzellen durchgeführten Inkubationsexperimente mit den gleichen siRNA Konzentrationen vergleichbare Resultate lieferten (Abb. 3.39). Allerdings konnte hier nur für das SBTEGGAL-Konjugat eine Dosis-Wirkung aufgezeigt werden. Die SB-GAL-modifizierte siRNA war aber in der Lage, in einer Konzentration von 10 μ M eine Abnahme der *apoB* m-RNA um 40% zu bewirken, während die 2xGAL siRNA auch hier keine Aktivität zeigte.

Anhand der Daten dieser Inkubationsexperimente ohne Transfektionshilfe kann davon ausgegangen werden, dass die Galaktose-konjugierten siRNAs ins Zytoplasma aufgenommen wurden. Für diese Internalisierung wird eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme durch den Asialoglykoprotein-Rezeptor angenommen.

4.4.2 Nachweis des Asialoglykoprotein-Rezeptors

Die Aufnahme der Zucker-konjugierten siRNAs soll über den Asialoglykoprotein-Rezeptor erfolgen. Allerdings wurde in dieser Arbeit noch kein direkter Nachweis der Existenz dieses Rezeptors in den verwendeten Zellen geführt. Daher wurde versucht mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die ASGPR H1 Untereinheit in humanen Zellen und das RHL 1 Protein in den Rattenhepatozyten die Expression des Rezeptors immunologisch nachzuweisen (Kapitel 2.3.3). Im erhaltenen Luminogramm (Abb. 3.43) konnten sowohl der in humanen Leberzellen exprimierte Rezeptor (46 kDa), als auch das in Rattenhepatozyten exprimierte Protein (41 kDa) nachgewiesen werden (Spiess und Lodish, 1985; Bischoff und Lodish, 1987; Halberg et al., 1987). Weitere Erläuterungen zum Asialoglykoprotein-Rezeptor sind in Abschnitt 4.4.3.3 zu finden.

4.4.3 Einfluss von Kalzium auf die Rezeptor-Funktion

4.4.3.1 Kalzium verstärkt die Wirkung der Galaktose-konjugierten siRNAs

In vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mit verzweigten Galaktose-Strukturen modifizierten siRNAs SBGAL und SBTEGGAL eine posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression von *apoB* bewirken, die sowohl auf Protein-, als auch auf m-RNA Ebene nachweisbar ist (Abschnitt 4.4.1, Abb. 3.32 A und B, Abb. 3.39). Um solche Interferenzeffekte auslösen zu können, müssen sich die siRNAs im Zytoplasma befinden (Elbashir et al., 2001). Es wird daher für die verzweigten Galaktose-Strukturen eine definierte Rezeptor-vermittelte Aufnahme über den Asialoglykoprotein-Rezeptor angenommen. Dieser ist für die Bindung und Internalisierung von Galaktose-modifizierten Molekülen bereits mehrfach beschrieben worden (Biessen et al., 2000; Biessen et al., 1999; Biessen et al., 1994; Rensen et al., 2001; Davis und Hui, 2001; Duff et al., 2000; Hangeland et al., 1995). Des Weiteren wird er zu den sogenannten C-Typ Lektinen auf der Oberfläche von Hepatozyten gerechnet, für deren Funktion eine Kalziumabhängigkeit nachgewiesen wurde (Drickamer, 1988). So konnte in Anwesenheit von Kalzium eine gesteigerte Funktion des Rezeptors beobachtet werden (Van Lenten und Ashwell, 1972). Für die folgenden Experimente zur Dosis-Wirkung wurden die verwendeten Zellen daher in 5 mM Kalziumchlorid angezogen, um den Rezeptor zu aktivieren. Es wurden die gleichen siRNAs und die gleichen Konzentrationen, wie im vorangegangenen Inkubationsexperiment (Abschnitt 4.41) verwendet, um einen Vergleich beider Inkubationen zu ermöglichen. Zusätzlich wurde eine weitere Negativkontrolle gegen die *bcl2* m-RNA eingesetzt, welche eine SBTEGGAL-Modifikation trägt, um einen Effekt der Modifikation selbst auszuschließen. Aus den erhaltenen Daten (Abb. 3.33 A und B) konnte für alle Galaktose-modifizierten siRNAs eine deutliche dosisabhängige Steigerung der inhibitorischen Effekte im Vergleich zu den Experimenten ohne Rezeptorstimulation erreicht werden. So wurde für die SBGAL modifizierte siRNA in höchster Konzentration eine Reduktion des Protein- und m-RNA Gehalts um rund 70% beobachtet (Abb. 3.33 A und B), während ohne Rezeptorstimulation nur eine 40%ige Reduktion bei gleicher Konzentration gezeigt werden konnte (Abb. 3.32 A und B). Für das apoB SBTEGGAL Konjugat ließ sich eine erstaunliche Reduktion von 90% auf Protein- und m-RNA Ebene nachweisen, verglichen mit einer 45%igen Reduktion ohne Zellanzucht in Kalziumchlorid. Da die

mitgeführten Negativkontrollen gegen die *bcl2* m-RNA ebenfalls mit SBGAL und SBTEGGAL-Modifikationen versehen wurden und diese keine inhibitorischen Effekte zeigten (Abb. 3.33 A und B), ist daher auch eine unspezifische Reduktion von ApoB durch die eingeführten Modifikationen selbst auszuschließen. Auch die siRNA mit zwei linear konjugierten Galaktose-Molekülen 2xGAL war in diesen Experimenten in der Lage, einen Interferenzeffekt von 20% auf Protein- und 50% auf m-RNA Ebene auszulösen (Abb. 3.33 A und B). Allerdings konnte hier keine Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden, da sich der erwähnte Effekt nur in der höchsten Konzentration von 10 µM beobachten ließ. Jedoch kann auch hier eine gesteigerte Aktivität des ASGPR angenommen werden, da dieses Konjugat in den vorangegangenen Inkubationen (Abb. 3.32) keine Aktivität zeigte. Das inhibitorische Potential der 3'-Chol modifizierten siRNA wurde durch die Zellanzucht in Kalziumchlorid dagegen nicht beeinflusst. So konnte mit und ohne Rezeptoraktivierung in der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µM siRNA eine Reduktion des *apoB* m-RNA Gehalts von nur 55% beobachtet werden (Abb. 3.32 B und 3.33 B). Des Weiteren ließ sich kein Reduktionseffekt für die unmodifizierte Sequenz nachweisen. Eine gesteigerte Aufnahme von Oligonukleotiden durch die Behandlung mit Kalziumchlorid ist daher auszuschließen. Die gezeigte Steigerung der Inhibitionseffekte bezieht sich demnach nur auf die Galaktose-modifizierten siRNAs. Diese Experimente lassen daher zusätzlich eine definierte Aufnahme über den Asialoglykoprotein-Rezeptor vermuten.

Gleiche Experimente in der Rattenzelllinie bestätigen die erhaltenen Daten (Abb. 3.40). So war auch hier eine Dosis-abhängige Reduktion der *apoB* m-RNA mit den verzweigten Galaktose-Molekülen zu detektieren. Bei einer Konzentration von 10 µM SBGAL siRNA war eine Reduktion des m-RNA Gehalts von 75% zu beobachten, während das SBTEGGAL-Konjugat in gleicher Konzentration eine Abnahme von 80% bewirkte.

Anzumerken ist, dass beide verzweigten Galaktose-Moleküle SBGAL und SBTEGGAL *in vitro* bei aktiviertem Rezeptor ein deutlich größeres Inhibitionspotential besitzen (Abb. 3.33 A und B), als die bereits im Tierversuch eingesetzte 3'-Chol modifizierte siRNA (Soutschek et al., 2004e).

4.4.3.2 Zellbiologische Hinweise auf eine gesteigerte Internalisierung der siRNAs nach Rezeptor-Aktivierung durch Kalzium

Eine Aufnahme der Zucker-konjugierten siRNAs wurde bisher nur indirekt anhand der festgestellten Reduktionen von ApoB gezeigt. Die Konjugation von Fluoreszenzfarbstoffen an Oligodesoxynukleotiden stellt eine herkömmliche Methode zur Visualisierung dieser Verbindungen innerhalb der Zellen dar (Biessen et al., 1999). Daher wurde ein Cy3 Fluoreszenzfarbstoff an die siRNA gekoppelt, um eine Aufnahme in die Zelle anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen sichtbar zu machen. Darüber hinaus wurde versucht, einen Unterschied an internalisierter fluoreszierender siRNA zwischen Zellen mit und ohne Rezeptor-Aktivierung durch Kalziumchlorid aufzuzeigen. Anhand der erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen (Abb. 3.34) konnte tatsächlich ein Unterschied in der Fluoreszenzintensität mit und ohne Rezeptor-Aktivierung deutlich gemacht werden. So war für die SBGAL- und SBTEGGAL-modifizierte siRNA ohne Zellanzucht in Kalziumchlorid kaum Rotfluoreszenz innerhalb der Zelle zu detektieren. Nach Zellanzucht in Kalziumchlorid konnte diese erheblich gesteigert werden, was ein zusätzlicher Hinweis auf eine gesteigerte Aktivität des Asialoglykoprotein-Rezeptors ist. Auf die ebenfalls mitgeführte 3'-Chol konjugierte siRNA hatte die Rezeptorstimulation, wie schon bei der Inkubation beobachtet (Abschnitt 4.3.4, Abb. 3.33 A und B), keinen Einfluss. Bei den Fluoreszenzaufnahmen mit einer ASGPR-Aktivierung ließ sich innerhalb der fluoreszierenden Fläche eine Aussparung erkennen (Abb. 3.34 Mitte). Durch eine DAPI Färbung konnte diese Aussparung als Zellkern identifiziert werden, der keine Cy3-Rotfluoreszenz enthielt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Cy3 markierten SBGAL und SBTEGGAL siRNAs in die Zelle aufgenommen wurden und dort im Zytoplasma akkumulierten, ohne in den Zellkern zu gelangen. Die zur Kontrolle mitgeführte unmodifizierte apoB Sequenz konnte die Zellmembran jedoch nicht passieren, weshalb keine Fluoreszenz innerhalb der Zellen detektiert wurde. Bei Vergrößerung eines Ausschnitts aus den aufgenommenen Fluoreszenzbildern (Abb 3.35) lässt sich sogar ein Unterschied in der Fluoreszenzverteilung innerhalb des Zytoplasmas deutlich machen. So konnte für das 3'-Chol- und das SBTEGGAL-Konjugat eine uniforme Verteilung der Fluoreszenz beobachtet werden, während das SBGAL-Konjugat nur in bestimmten Bereichen des Zytoplasmas akkumulierte. Diese Beobachtung ist eventuell auf den Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Aufnahme zurückzuführen. So ist für den

Asialoglykoprotein-Rezeptor eine Internalisierung über die Abschnürung von Vesikeln und ein vesikulärer Transport der internalisierten Substanz zum Endosom bzw. Lysosom beschrieben (Stoorvogel et al., 1987; Clarke et al., 1987; Dalton et al., 2004). Bei der punktuell auftretenden Fluoreszenz der SBGAL-konjugierten siRNA könnte es sich um Moleküle handeln, die sich entweder noch in Transportvesikeln befinden, oder aber bereits in lysosomalen Kompartimenten gefangen sind. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung dafür, weshalb die SBGAL-modifizierte siRNA einen geringeren Inhibitionseffekt bei den Inkubationsexperimenten zeigte als das für das SBTEGGAL-konjugierte Molekül der Fall war (Abschnitt 4.3.4, Abb. 3.33.A und B). Somit hätte die Konjugation eines zusätzlichen Tetraethylenglykol-Linkers zwischen der RNA und den Galaktose-Strukturen einen positiven Einfluss auf die endosomale Freisetzung, da sich die SBTEGGAL siRNA gleichmäßig im Zytoplasma verteilte (Abb. 3.35). Dies ist allerdings nicht nachgewiesen und kann nur anhand der hier aufgenommenen Fluoreszenzbilder spekuliert werden. Möglicherweise wird durch den erhöhten Abstand ($\sim 16 \text{ \AA}$) zwischen den Galaktose-Resten und der negativ geladenen siRNA im SBTEGGAL-Konjugat eine stärkere Bindung an den Rezeptor bedingt als das für das SBGAL-Konjugat der Fall ist. Somit könnte das SBTEGGAL-Konjugat bei dem „Recycling“ Prozess des ASGPR zurück ins Zytoplasma geholt werden, während die Bindung des SBGAL-Konjugats zum Rezeptor im endosomalen Kompartiment gelöst wird.

4.4.3.3 Charakterisierung des Einflusses von Kalzium auf die gesteigerte Rezeptor- und siRNA-Aktivität

Wie bereits unter Abschnitt 4.4.2 dargelegt, konnte der Asialoglykoprotein-Rezeptor anhand von Western-Blot Analysen in beiden Leberkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (Abb. 3.34). Des Weiteren sollte ein eventueller Einfluss des Kalziumchlorids bei Zellanzucht auf den Proteingehalt untersucht werden. Es zeigt sich jedoch kein Unterschied im Proteingehalt zwischen einer Zellanzucht in 0 mM und 5 mM Kalziumchlorid. Daher ist ein Effekt des Kalziumchlorids auf die Proteinexpression auszuschließen. Allerdings korreliert der Zusatz von Kalziumchlorid direkt mit der Funktion des Rezeptors (Van Lenten und Ashwell, 1972). Es ist vielmehr davon auszugehen, dass wie bereits für das Mannose-bindende Protein (MBP = Mannose Binding Protein) gezeigt, eine Koordination der verschiedenen Aminosäuren der „Carbohydrate Recognition Domain“ (CRD) durch Ca^{2+} Ionen erfolgt (Ng et al., 1996;

lobst und Drickamer, 1994; lobst et al., 1994). Des Weiteren wird die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen dem gebundenen Zucker und definierten Aminosäuren des Rezeptors angenommen, die gleichzeitig als Kalzium-Liganden fungieren. Auf diese Weise werden durch verschiedene Lektine auf der Zelloberfläche unterschiedliche Zuckerstrukturen erkannt, gebunden und internalisiert. Allerdings bestehen unterschiedliche Präferenzen dieser Lektine im Hinblick auf ihre Substrate und damit auch ihrer Funktion. Für den Asialoglykoprotein-Rezeptor beispielsweise wird angenommen, dass die Entfernung von funktionsgestörten Glykoproteinen aus dem Blutkreislauf eine seiner Hauptaufgaben ist. Diese tragen nach Abspaltung eines Sialinsäure-Restes terminale verzweigte Galaktose- und *N*-Acetylgalaktosamin-Strukturen, welche von der CRD des Rezeptors erkannt werden (Rensen et al., 2001). Weiterhin könnte ein Einfluss des Kalziums auf die endosomale Freisetzung der siRNAs diskutiert werden. So wurde bereits für Antisense PNA Moleküle nach Konjugation mit zellpenetrierenden Peptiden ein positiver Einfluss von Ca^{2+} Ionen gezeigt (Shiraishi et al., 2005; Shiraishi et al., 2006). Allerdings wird auch für Cholesterin-modifizierte Moleküle eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme angenommen, bei der ebenfalls endosomale Kompartimente beteiligt sind (Krieg et al., 1993; de Smidt et al., 1991). Die Zellanzucht in 5 mM Kalziumchlorid hatte jedoch keinen positiven Einfluss auf die Aktivität der 3'-Chol konjugierten siRNA. Es wurden mit und ohne Kalziumchlorid die gleichen Interferenz-Effekte beobachtet (Abb. 3.33 und 3.34). Durch den Einsatz von Chloroquine, welches ebenfalls einen positiven Einfluss auf die endosomale Freisetzung hat, konnte nur für die 3'-Chol siRNA eine gesteigerte Aktivität beobachtet werden, nicht aber für die Zucker-konjugierten Moleküle (Daten nicht gezeigt). Somit ist eine Beteiligung endosomaler Kompartimente beim Transport der 3'-Chol siRNA ins Zytoplasma anzunehmen. Allerdings konnte kein positiver Effekt von Ca^{2+} Ionen auf die Entlassung der 3'-Chol siRNA ins Zytoplasma gezeigt werden. Daher ist vielmehr davon auszugehen, dass es sich um eine Aktivierung bzw. Stimulation des Asialoglykoprotein-Rezeptors durch Kalziumchlorid handelt wie bereits diskutiert, die keinen Einfluss auf die Aktivität Cholesterin-konjugierter siRNAs hat.

4.4.4 Konkurrenz mit *N*-Acetylgalaktosamin

Für die Aufnahme der Galaktose-konjugierten siRNAs wurde eine Internalisierung über den Asialoglykoprotein-Rezeptor postuliert. Es konnte bisher eine erhöhte Aufnahme der SBGAL und SBTEGGAL-konjugierten siRNAs in humane und Ratten-Hepatozyten nach Aktivierung des Rezeptors mit Kalziumchlorid nachgewiesen werden (Abschnitt 4.4.3) und eine damit verbundene dosisabhängige, posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression (Abschnitt 4.4.3.1). Anhand von Konkurrenzstudien sollte im folgenden Experiment gezeigt werden, dass durch Zusatz eines stärkeren Liganden für den Asialoglykoprotein-Rezeptor eine Aufnahme der siRNAs und damit eine Reduktion von *apoB* verhindert werden sollte. Laut Literatur besitzt *N*-Acetylgalaktosamin eine ~ 40-fach höhere Affinität für den Rezeptor als Galaktose und wurde deshalb als Konkurrent eingesetzt (Biessen et al., 1994; Rensen et al., 2001; Iobst und Drickamer, 1996). Anhand der erhaltenen Daten (Abb. 3.36 A und B, Abb. 3.41) konnte gezeigt werden, dass durch Zusatz von *N*-Acetylgalaktosamin die beobachtete posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression unterbunden werden konnte. Für keine der Galaktose-konjugierten siRNAs war eine Abnahme des Protein- bzw. m-RNA Gehalts mehr nachweisbar. Daraus resultiert der Schluss, dass die Aufnahme der siRNAs durch den Asialoglykoprotein-Rezeptor durch Zusatz eines stärker bindenden Substrats verhindert wurde. Im Umkehrschluss ist somit eine definierte Rezeptor-vermittelte Aufnahme von modifizierten siRNAs in das Zytoplasma erstmals bewiesen. Zwar wird in der Literatur von Cholesterin-modifizierten Oligoribo- und Oligodesoxynukleotiden berichtet, der genaue Mechanismus dieser Aufnahme ist allerdings bis heute nicht geklärt. So gibt es Vermutungen der Beteiligung des Scavenger Rezeptors oder aber des LDL-Rezeptor Mechanismus [(Krieg et al., 1993; Rump et al., 2000; Bijsterbosch et al., 2000; Bijsterbosch et al., 2002), persönliche Kommunikation mit M. Stoffel, Rockefeller Universität, April 2005]. Da durch den Zusatz des Konkurrenten in dieser Arbeit der inhibitorische Effekt der 3'-Chol modifizierten siRNA nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.36 und 3.41), korreliert diese Beobachtung mit den veröffentlichten Daten eines anderen Aufnahmemechanismus für Cholesterin-konjugierte Moleküle im Vergleich zu Zucker-modifizierten Verbindungen.

4.5 Ausblick

Mit Hilfe der Glykokonjugation von verzweigten Galaktose-Strukturen an siRNAs konnte in dieser Arbeit erstmals eine definierte Rezeptor-vermittelte Aufnahme über den Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) gezeigt werden. Infolge dessen war eine posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression möglich. Diese Ergebnisse stellen einen Ansatzpunkt hinsichtlich der Entwicklung von RNAi-basierenden Therapeutika dar und liefern einen wichtigen Beitrag zur Durchführung erster *in vivo* Experimente. Die Expression des ASGPR in Ratten wurde bereits beschrieben (Weigel, 1980) und es ist davon auszugehen, dass dieser Rezeptor auch *in vivo* die gleiche Präferenz für die Bindung und Internalisierung seiner Substrate besitzt. In der Antisense-Forschung wurde bereits erfolgreich die Aufnahme glykokonjugierter Oligodesoxynukleotide durch diesen Rezeptor gezeigt (Biessen et al., 2000; Biessen et al., 1999; Rensen et al., 2001). Eine vorzeitige Eliminierung des Wirkstoffs über Degradierung, Scavenger-Rezeptor-vermittelte Aufnahme in ungewünschte Zelltypen oder Absorption durch die Niere wurde durch die Glykokonjugation verhindert (Biessen et al., 1999). Daher sollte in weiterführenden Arbeiten eine systemische Applikation der Zucker-konjugierten siRNAs in Ratten versucht werden. Des weiteren wurde eine stärkere Bindung an den Rezeptor für Strukturen deutlich gemacht, welche drei oder vier terminale Galaktose-Reste tragen (Rensen et al., 2001). Durch eine weitere Verzweigung der zwei terminalen Galaktose-Reste der hier synthetisierten siRNAs SBGAL und SBTEGGAL kann während der RNA-Festphasensynthese ohne großen Aufwand die Anknüpfung des hergestellten Gal-Amidits **18** ermöglicht werden, so dass eine siRNA mit vier endständigen Galaktopyranosiden entsteht. Dies könnte zu einer stärkeren Bindung des Konjugats an den Rezeptor führen (Rensen et al., 2001). Gleichermäßen kann durch die Verwendung eines anderen Linkers als Tetraethylenglykol der Abstand zwischen der negativ geladenen siRNA und der Galaktose-Modifikation variiert werden. In der Literatur wird die Verlängerung eines solchen Linkers als positiv für die Aufnahme über den ASGPR beschrieben (Biessen et al., 1994). Da mit der siRNA Technologie die posttranskriptionelle Hemmung der Genexpression für theoretisch jedes krankheitsauslösende Protein erreicht werden kann, ist eine breite Anwendung dieses Prinzips möglich. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Ansatz siRNAs gezielt in Leberzellen einzubringen, könnte z.B. auch eine alternative Therapie gegen den Hepatitis C Virus entwickelt werden oder viele andere Leber-spezifische Krankheiten.

5 Zusammenfassung

Um therapeutisch wirksam zu sein, muss eine siRNA die Zellmembran überwinden und ins Zytoplasma gelangen. Auf Grund der negativen Ladung unmodifizierter Nukleinsäuren und des hohen Molekulargewichts ist eine passive Permeation ins Zytoplasma unwahrscheinlich. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, durch die Anknüpfung kleiner Moleküle an den 5'-Terminus des Sense Strangs einer siRNA deren Aufnahme ins Zytoplasma zu erreichen. Hierzu wurden verschiedene siRNA-Konjugate synthetisiert, welche in einem *in vitro* Modellsystem ohne Verwendung eines Transfektionsreagenzes die posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression in Leberparenchymzellen ermöglichen.

Ein erster Ansatz zielte auf die Erhöhung der Hydrophobizität der siRNAs und eine damit verbundene Erleichterung der zellulären Annäherung. Als Grundbausteine dienten Lithocholsäure, Cholesterin, Betulin und 3-Beta-Cholestanol. Durch kurze organisch chemische Synthesesequenzen wurden diese Verbindungen in das entsprechende Phosphoramidit überführt, um eine Kopplung während der RNA-Festphasensynthese zu ermöglichen. Unter Verwendung verschiedener Linker konnte das Spektrum der Modifikationen erweitert werden. Des Weiteren wurde versucht, durch Amidbindungsknüpfung zwischen einer NHS-Ester aktivierten siRNA und verschiedenen Aminen, kationischen Aminosäuren und Dipeptiden, die Lipophilie der siRNA zu erhöhen. So sollte eine Aufnahme über Zellpenetration, bestimmte Aminosäurekanäle oder Nährstofftransporter erreicht werden. In einem weiteren Ansatz wurde eine definierte Rezeptor-vermittelte Aufnahme nach Glykokonjugation der siRNA mit linearen und verzweigten Galaktose-Strukturen zur Überwindung der Zellmembran angestrebt. Hierzu wurde β -D-Galaktosepentaacetat in ein Phosphoramidit umgewandelt und während der RNA-Festphasensynthese verschiedene siRNA-Konjugate synthetisiert.

Zunächst wurden die Eigenschaften der modifizierten siRNAs untersucht. Anhand von Transfektionsexperimenten wurde deren Aktivität im Hinblick auf die posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression gezeigt. Mit Hilfe eines Membranintegritätstests konnten keine zytotoxischen Eigenschaften für die verwendeten Zelllinien detektiert werden. Der Fokus der folgenden Dosis-Wirkungs-Experimente richtete sich auf die Galaktose-konjugierten Nukleinsäuren.

Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte sowohl in An- als auch in Abwesenheit eines Transfektionsreagenzes für das SBGAL- und SBTEGGAL-Konjugat nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Glykokonjugation von verzweigten Galaktose-Strukturen an siRNAs konnte in dieser Arbeit erstmals eine definierte Rezeptor-vermittelte Aufnahme über den Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) gezeigt werden. Infolge dessen war eine posttranskriptionelle Hemmung der *apoB* Genexpression in humanen Leberkarzinomzellen möglich. Durch Stimulation dieses Rezeptors mit Kalziumchlorid konnten die beobachteten RNA-Interferenz-Effekte erheblich gesteigert werden. Die SBGAL-modifizierte siRNA bewirkte in einer Konzentration von 10 μ M eine 70%ige Reduktion der *apoB* m-RNA, während mit dem SBTEGGAL-Konjugat eine Abnahme des m-RNA Gehalts um 90% gezeigt werden konnte. Anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen Cy3-markierter SBGAL- und SBTEGGAL-Konjugate wurde eine Internalisierung dieser siRNAs ins Zytoplasma deutlich gemacht, wobei durch Aktivierung des Rezeptors eine vermehrte Aufnahme der siRNAs ins Zytoplasma zu beobachten war. In den durchgeführten Kompetitionsstudien wurde durch Zusatz des stärker an den Rezeptor bindenden Liganden *N*-Acetylgalaktosamin eine Internalisierung der siRNAs verhindert und es konnten keine RNA-Interferenz-Effekte mehr detektiert werden.

Alle Experimente zur Dosis-Wirkung, Rezeptorstimulation sowie die Kompetitionsstudien wurden mit vergleichbaren Ergebnissen in einer Rattenleberkarzinomzelllinie bestätigt.

Diese Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung von RNAi-basierenden Therapeutika und eröffnen neue Möglichkeiten für die gezielte Ablieferung von siRNAs in Leberparenchymzellen bei kommenden *in vivo* Experimenten.

6 Summary

Therapeutic application of siRNAs requires delivery to the correct intracellular compartment. Due to their negative charge and high molecular weight, unmodified nucleic acids are unable to cross cellular membranes. The aim of this work was to achieve uptake of siRNAs into the cytoplasm of target cells without the use of transfection reagents, by coupling small molecules to the 5'-end of the sense strand of the siRNA. As a result of enhanced membrane permeation, these conjugates should be capable of causing posttranscriptional silencing in the absence of transfection reagents. Parenchymal liver cells constitutionally expressing the *apoB* gene were used as a model system, and the ability of modified siRNAs to silence *apoB* gene expression in these cells were analyzed.

A first approach aimed at the formation of hydrophobic siRNA conjugates to alleviate cellular association and improve cytoplasmic delivery. To this end, lithocholic acid, cholesterol, betulin and 3-beta-cholestanol were chemically modified to yield the corresponding phosphoramidites that were directly used as coupling agent in RNA solid phase synthesis. A variety of different linkage structures broadened the chemical space probed by this investigation. Alternatively, several amines, cationic amino acids and dipeptides were coupled via amide bond formation to siRNAs activated by NHS linkages. Using this approach, the goal was to increase the lipophilicity of the siRNA and to permit uptake via cell penetration or amino acid and nutrient transport systems. Finally, it was undertaken to generate uptake via receptor-mediated processes. Glycoconjugation of siRNAs with linear and branched structures comprising galactose was selected to target the asialoglycoprotein receptor. A phosphoramidite was generated from β -D-Galactosepentaacetate and different siRNA conjugates were synthesized by solid phase synthesis.

The ability of the above described conjugates to mediate posttranscriptional silencing of the *apoB* gene expression was demonstrated by classic transfection experiments. Cytotoxic effects, which could potentially be interpreted as false positives, were ruled out by means of a membrane integrity assay. The subsequent dose-response experiments focused on the galactose-modified siRNAs. Ultimately, a dose-dependent reduction of the apoB protein and mRNA content could be demonstrated in the presence or absence of a transfection reagent.

The results presented herein show for the first time a receptor-mediated uptake via the asialoglycoprotein receptor as a consequence of glycoconjugation of siRNAs with branched galactose structures. Thereby, posttranscriptional silencing of the *apoB* gene expression was achieved in parenchymal human liver cells. Stimulation of this receptor with calcium chloride significantly increased siRNA activity. A SBGAL-conjugated siRNA decreased *apoB* mRNA by about 70% at a concentration of 10 μ M. At the same concentration a SBTEGGAL-conjugated siRNA reduced mRNA content by about 90%. Localisation of the siRNA to the cytoplasm was demonstrated by fluorescence microscopy. Calcium-dependent receptor activation enhanced intracellular fluorescence. The uptake of siRNAs und the mRNA reduction could competed out by an excess of *N*-acetylgalactosamine, the latter having a 40-fold higher binding affinity for the receptor compared to galactose.

The above described experiments were repeated und results confirmed using a rat hepatocyte cell line.

These results represent a significant advancement of RNAi-based therapeutics und establish a new strategy for the delivery of siRNAs to parenchymal liver cells *in vivo*.

7 Abkürzungen

Å	Angström
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Ac ₂ O	Acetanhydrid
Ago2	Argonaut Protein 2
AgOTf	Silbertriflat
ApoB	Apolipoprotein B 100
Äq	Äquivalent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASGPR	Asialoglykoprotein-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
b-DNA	branched DNA
Bet	Betulin
3BChol	3-Beta-Cholestanol
BP	Blocking Probe (b-DNA)
CE	Capture Extender (b-DNA)
2-CETIP	2-Cyanoethyltetraisopropylphosphan
2-CEDICP	2-Cyanoethyl-diisopropylchlorophosphoramidit
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CH	Cyclohexan
Chol	Cholesterin
CPG	Controlled Pore Glass
Cy3	Indodicarbocyanin 3
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	<i>p-N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMT	Dimethoxytrityl

DMT-Cl	4,4'-Dimethoxytriphenylchlormethan
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure (double stranded RNA)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC _x HCl	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
EDITH	3-Ethoxy-1,2,4-dithiazolin-5-on
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
ETT	Ethylthiotetrazol
exp.	experimentell
FCS	Fetal Calf Serum
GAL	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-galaktosamin
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HPLC	High Pressure (Performance) Liquid Chromatography
kDa	Kilo Dalton
LE	Label Extender (b-DNA)
LC	Liquid Chromatography
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
Litho	Lithocholsäure
MDR	Multi Drug Resistent
MeOH	Methanol
min	Minute
MMT	Monomethoxytrityl
MMT-Cl	4-Methoxytriphenylchlormethan
m-RNA	messenger RNA
MS	Massenspektroskopie
NaOMe	Natriummethylat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-Pyrrolidon

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nt	Nukleotid
o	ortho
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pd(OH) ₂ -C	Palladiumhydroxid auf Aktivkohle
PKR	Proteinkinase R
Pyr	Pyridin
rA	Adenosin
rC	Cytidin
rG	Guanosin
rU	Uridin
RISC	RNA Induced Silencing Complex
Rf	Retentionsfaktor
RLC	RISC Loading Complex
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SB	Symmetrical Branch
SDS	Sodium Dodecylsulfate
sec	Sekunde
siRNA	Small Interfering RNA
SNALP	Stable Nucleic Acid Lipid Particle
SSC	Sodium Chloride/Citrate
ssRNA	Einzelstrang RNA (single stranded RNA)
TAC	<i>tert</i> -Butylphenoxyacetyl
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyl-dimethylsilyl
TBE	Tris Boric Acid EDTA
TBS	<i>tert</i> -Butyl-silyl
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethylamin

TEAxHF	Triethylamin-trihydrofluorid
TEDT	Tris/EDTA/DTT/Triton
TEG	Tetraethylenglykol
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
ü.N.	über Nacht
V	Volumen
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

8 Literatur

Adams, A. RNA Therapeutics Enter Clinical Trials. Technology . 2005.
Ref Type: In Press

Albertshofer,K., Siwkowski,A.M., Wancewicz,E.V., Esau,C.C., Watanabe,T., Nishihara,K.C., Kinberger,G.A., Malik,L., Eldrup,A.B., Manoharan,M., Geary,R.S., Monia,B.P., Swayze,E.E., Griffey,R.H., Bennett,C.F., und Maier,M.A. (2005). Structure-activity relationship study on a simple cationic peptide motif for cellular delivery of antisense peptide nucleic acid. *J Med. Chem.* **48**, 6741-6749.

Antopolsky,M., Azhayeva,E., Tengvall,U., Auriola,S., Jaaskelainen,I., Ronkko,S., Honkakoski,P., Urtti,A., Lonnberg,H., und Azhayev,A. (1999). Peptide-oligonucleotide phosphorothioate conjugates with membrane translocation und nuclear localization properties. *Bioconjug. Chem.* **10**, 598-606.

Astriab-Fisher,A., Sergueev,D.S., Fisher,M., Shaw,B.R., und Juliano,R.L. (2000). Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 83-90.

Berns,K., Hijmans,E.M., Mullenders,J., Brummelkamp,T.R., Velds,A., Heimerikx,M., Kerkhoven,R.M., Madiredjo,M., Nijkamp,W., Weigelt,B., Agami,R., Ge,W., Cavet,G., Linsley,P.S., Beijersbergen,R.L., und Bernards,R. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**, 431-437.

Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., und Hannon,G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.

Biessen,E.A., Vietsch,H., Rump,E.T., Fluiter,K., Bijsterbosch,M.K., und van Berkel,T.J. (2000). Targeted delivery of antisense oligonucleotides to parenchymal liver cells in vivo. *Methods Enzymol.* **314**, 324-342.

Biessen,E.A., Vietsch,H., Rump,E.T., Fluiter,K., Kuiper,J., Bijsterbosch,M.K., und van Berkel,T.J. (1999). Targeted delivery of oligodeoxynucleotides to parenchymal liver cells in vivo. *Biochem. J.* **340** (Pt 3), 783-792.

Biessen,E.A., Vietsch,H., und van Berkel,T.J. (1994). Cholesterol derivative of a new triantennary cluster galactoside directs low- und high-density lipoproteins to the parenchymal liver cell. *Biochem. J* **302** (Pt 1), 283-289.

Bijsterbosch,M.K., Manoharan,M., Dorland,R., van Veghel,R., Biessen,E.A., und van Berkel,T.J. (2002). bis-Cholesteryl-conjugated phosphorothioate oligodeoxynucleotides are highly selectively taken up by the liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 619-626.

Bijsterbosch,M.K., Rump,E.T., de Vruet,R.L., Dorland,R., van Veghel,R., Tivel,K.L., Biessen,E.A., van Berkel,T.J., und Manoharan,M. (2000). Modulation of plasma protein binding und in vivo liver cell uptake of phosphorothioate oligodeoxynucleotides by cholesterol conjugation. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2717-2725.

- Bischoff, J. und Lodish, H.F. (1987). Two asialoglycoprotein receptor polypeptides in human hepatoma cells. *J Biol. Chem.* 262, 11825-11832.
- Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunenko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S., Court DL, und Ji, X. (2001). Crystallographic und modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure.* 9, 1225-1236.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid und sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brantl, S. (2002). Antisense-RNA regulation und RNA interference. *Biochim. Biophys. Acta* 1575, 15-25.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.-L., und Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* 34, 263-264.
- Brooks, H., Lebleu, B., und Vives, E. (2005a). Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 559-577.
- Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Burnett, J.R. und Barrett, P.H. (2002). Apolipoprotein B metabolism: tracer kinetics, models, und metabolic studies. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 39, 89-137.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose und radiographic detection with antibody und radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Carmell, M.A. und Hannon, G.J. (2004). RNase III enzymes und the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 214-218.
- Clarke, B.L., Oka, J.A., und Weigel, P.H. (1987). Degradation of asialoglycoproteins mediated by the galactosyl receptor system in isolated hepatocytes. Evidence for two parallel pathways. *J Biol. Chem.* 262, 17384-17392.
- Collins, M.L., Irvine, B., Tyner, D., Fine, E., Zayati, C., Chang, C., Horn, T., Ahle, D., Detmer, J., Shen, L.P., Kolberg, J., Bushnell, S., Urdea, M.S., und Ho, D.D. (1997). A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Res* 25, 2979-2984.
- Couzin, J. (2002). Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 298, 2296-2297.
- Dalton, S.R., Wiegert, R.L., und Casey, C.A. (2004). An in vivo Method for Determination of Endosomal Distribution of Both Ligand und Asialoglycoprotein Receptor in Rat Liver. *Comp Hepatol.* 3 Suppl 1, S38.
- Damha, M.J. und Ogilvie, K.K. (1993). Oligoribonucleotide synthesis. The silyl-phosphoramidite method. *Methods Mol. Biol.* 20, 81-114.

- Davidson,N.O. und Shelness,G.S. (2000). APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, und presecretory degradation. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 169-193.
- Davis,R.A. und Hui,T.Y. (2001). 2000 George Lyman Duff Memorial Lecture: atherosclerosis is a liver disease of the heart. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 887-898.
- de Smidt,P.C., Le Doan,T., De Falco,S., und van Berkel,T.J. (1991). Association of antisense oligonucleotides with lipoproteins prolongs the plasma half-life und modifies the tissue distribution. *Nucleic Acids Res* 19, 4695-4700.
- Drickamer,K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol. Chem.* 263, 9557-9560.
- Duff,R.J., Deamond,S.F., Roby,C., Zhou,Y., und Ts'o,P.O. (2000). Intrabody tissue-specific delivery of antisense conjugates in animals: ligand-linker-antisense oligomer conjugates. *Methods Enzymol.* 313, 297-321.
- Dykxhoorn,D.M. und Lieberman,J. (2006). Running Interference: Prospects und Obstacles to Using Small Interfering RNAs as Small Molecule Drugs. *Annu. Rev. Biomed. Eng* 8, 15.1-15.26.
- Dykxhoorn,D.M. und Novina,C.D.a.S.P.A. (2003). Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 457-467.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., und Tuschl,T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir,S.M., Lendeckel,W., und Tuschl,T. (2001). RNA interference is mediated by 21- und 22-nucleotide RNAs. *G&D* 15, 188-200.
- Elbashir,S.M., Martinez,J., Patkaniowska,A., Lendeckel,W., und Tuschl,T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- FAZ online. Nobelpreis für Medizin geht an zwei Amerikaner. FAZ online . 2-10-2006.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., und Mello,C.C. (1998). Potent und specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Gait,M.J. (2003). Peptide-mediated cellular delivery of antisense oligonucleotides und their analogues. *Cell Mol Life Sci.* 60, 844-853.
- Ge,Q., Filip,L., Bai,A., Nguyen,T., Eisen,H.N., und Chen,J. (2004). Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 8676-8681.
- Gilar,M., Fountain,K.J., Budman,Y., Holyoke,J.L., Davoudi,H., und und Gebler,J.C. (2003). Characterization of Therapeutic Oligonucleotides Using Liquid Chromatography with On-line Mass Spectrometry Detection. *Oligonucleotides* 13, 229-243.

- Glueck,C.J., Kelley,W., Gupta,A., Fontaine,R.N., Wang,P., und Gartside,P.S. (1997). Prospective 10-year evaluation of hypobetalipoproteinemia in a cohort of 772 firefighters und cross-sectional evaluation of hypocholesterolemia in 1,479 men in the National Health und Nutrition Examination Survey I. *Metabolism* 46, 625-633.
- Godzina,P., Adrych-Rozek,K., und Markiewicz,W.T. (1999). Synthetic Oligonucleotide Combinatorial Libraries. 3. Synthesis of Polyaminonucleosides. *Nucleosides Nucleotides* 18, 2397-2414.
- Guo,S. und Kemphues,J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620.
- Halberg,D.F., Wager,R.E., Farrell,D.C., Hildreth,J., Quesenberry,M.S., Loeb,J.A., Holland,E.C., und Drickamer,K. (1987). Major und minor forms of the rat liver asialoglycoprotein receptor are independent galactose-binding proteins. Primary structure und glycosylation heterogeneity of minor receptor forms. *J Biol. Chem.* 262, 9828-9838.
- Hammond,S.M., Boettcher,S., Caudy,A.A., Kobayashi,R., und Hannon,G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic und biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-1150.
- Hangeland,J.J., Levis,J.T., Lee,Y.C., und Ts'o,P.O. (1995). Cell-type specific und ligand specific enhancement of cellular uptake of oligodeoxynucleoside methylphosphonates covalently linked with a neoglycopeptide, YEE(ah-GalNAc)3. *Bioconj. Chem.* 6, 695-701.
- Hannon,G.J. und Rossi,J.J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378.
- Ho,A., Schwarze,S.R., Mermelstein,S.J., Waksman,G., und Dowdy,S.F. (2001). Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro und in vivo. *Cancer Res* 61, 474-477.
- Hutvagner,G. und Zamore,P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.
- lobst,S.T. und Drickamer,K. (1994). Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. *J Biol. Chem.* 269, 15512-15519.
- lobst,S.T. und Drickamer,K. (1996). Selective sugar binding to the carbohydrate recognition domains of the rat hepatic und macrophage asialoglycoprotein receptors. *J Biol. Chem.* 271, 6686-6693.
- lobst,S.T., Wormald,M.R., Weis,W.I., Dwek,R.A., und Drickamer,K. (1994). Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis und NMR. *J Biol. Chem.* 269, 15505-15511.
- Jarver,P. und Langel,U. (2004). The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discov. Today* 9, 395-402.

John,M., Geick,A., Hadwiger,P., Vornlocher,H.-P., und Heidenreich,O. (2003). Gene silencing by RNAi in mammalian cells. In *Current protocols in molecular biology*, F.M.Ausubel, R.Brent, R.E.Kingston, D.D.Moore, J.G.Seidman, J.A.Smith, und K.Struhl, eds. (New York: John Wiley & Sons), p. 26.2.1-26.2.14.

John,M., Geick,A., Hadwiger,P., Vornlocher,H.-P., und Heidenreich,O. (2005). Gene silencing methods for mammalian cells: Application of synthetic short interfering RNAs. In *Handbook of RNA Biochemistry*, A.Bindereif, R.Hartmann, A.Schön, und E.Westhof, eds. (Weinheim: Wiley-VCH), pp. 897-909.

Jorgensen,R.A., Cluster,P.D., English,J., Que,Q., und Napoli,C.A. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs und single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.* **31**, 957-973.

Joshua-Tor,L. (2004). siRNAs at RISC. *Structure*. **12**, 1120-1122.

Karinaga,R., Anada,T., Minari,J., Mizu,M., Koumoto,K., Fukuda,J., Nakazawa,K., Hasegawa,T., Numata,M., Shinkai,S., und Sakurai,K. (2006). Galactose-PEG dual conjugation of beta-(1-->3)-D-glucan schizophyllan for antisense oligonucleotides delivery to enhance the cellular uptake. *Biomaterials* **27**, 1626-1635.

Khvorova,A., Reynolds,A., und Jayasena,S.D. (2003). Functional siRNAs und miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216.

Kilk,K., El Andaloussi,S., Jarver,P., Meikas,A., Valkna,A., Bartfai,T., Kogerman,P., Metsis,M., und Langel,U. (2005). Evaluation of transportan 10 in PEI mediated plasmid delivery assay. *J Control Release* **103**, 511-523.

Kilk,K., Elmquist,A., Saar,K., Pooga,M., Land,T., Bartfai,T., Soomets,U., und Langel,U. (2004). Targeting of antisense PNA oligomers to human galanin receptor type 1 mRNA. *Neuropeptides* **38**, 316-324.

Kim,S.H., Mok,H., Jeong,J.H., Kim,S.W., und Park,T.G. (2006). Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, und siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate. *Bioconjug. Chem.* **17**, 241-244.

Kramer,W., Wess,G., Schubert,G., Bickel,M., Girbig,F., Gutjahr,U., Kowalewski,S., Baringhaus,K.H., Enhnen,A., Glombik,H., und . (1992). Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids. *J Biol. Chem.* **267**, 18598-18604.

Krieg,A.M., Tonkinson,J., Matson,S., Zhao,Q., Saxon,M., Zhang,L.M., Bhanja,U., Yakubov,L., und Stein,C.A. (1993). Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5' cholesteryl moiety increases cellular association und improves efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 1048-1052.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Leary,J.J., Brigati,D.J., und Ward,D.C. (1983). Rapid und sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 4045-4049.

- Lee, R.T. und Lee, Y.C. (1986). Preparation of a high-affinity photolabeling reagent for the Gal/GalNAc lectin of mammalian liver: demonstration of galactose-combining sites on each subunit of rabbit hepatic lectin. *Biochemistry* 25, 6835-6841.
- Lehmann, T.J. und Engels, J.W. (2001). Synthesis und properties of bile acid phosphoramidites 5'-tethered to antisense oligodeoxynucleotides against HCV. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 1827-1835.
- Letsinger, R.L., Zhang, G.R., Sun, D.K., Ikeuchi, T., und Sarin, P.S. (1989). Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, und activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 6553-6556.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., und Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Li, S., Deshmukh, H.M., und Huang, L. (1998). Folate-mediated targeting of antisense oligodeoxynucleotides to ovarian cancer cells. *Pharm. Res* 15, 1540-1545.
- Lingel, A. und Sattler, M. (2005). Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 107-115.
- Liu, X., Jiang, F., Kalidas, S., Smith, D., und Liu, Q. (2006). Dicer-2 und R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA*. 12, 1514-1520.
- Lohmann, J.U., Endl, I., und Bosch, T.C.G. (1999). Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev. Biol.* 214, 211-214.
- Lorenz, C., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H.-P., und Unverzagt, C. (2004). Steroid und lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake und gene silencing in liver cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4975-4977.
- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., und Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434, 666-670.
- Ma, Z., Li, J., He, F., Wilson, A., Pitt, B., und Li, S. (2005). Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 330, 755-759.
- MacKellar, C., Graham, D., Will, D.W., Burgess, S., und Brown, T. (1992). Synthesis und physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups. *Nucleic Acids Res* 20, 3411-3417.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., und Doudna, J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.
- Mae, M. und Langel, U. (2006). Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein und oligonucleotide delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 509-514.

- Manoharan,M. (2002). Oligonucleotide conjugates as potential antisense drugs with improved uptake, biodistribution, targeted delivery, und mechanism of action. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12, 103-128.
- Manoharan,M., Tivel,K.L., Andrade,L.K., Mohan,V., Condon,T.P., Bennett,C.F., und Cook,P.D. (1995). Oligonucleotide conjugates: alteration of the pharmacokinetic properties of antisense agents. *Nucleosides Nucleotides* 14, 969-973.
- Martinez,J. und Tuschl,T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18, 975-980.
- Martinez,M.A., Clotet,B., und Este,J.A. (2002). RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol.* 23, 559-561.
- McCaffrey,A.P., Meuse,L., Pham,T.T., Conklin,D.S., Hannon,G.J., und Kay,M.A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 38-39.
- McCaffrey,A.P., Nakai,H., Pandey,K., Huang,Z., Salazar,F.H., Xu,H., Wieland,S.F., Marion,P.L., und Kay,M.A. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 21, 639-644.
- Miller,V.M., Gouvion,C.M., Davidson,B.L., und Paulson,H.L. (2004). Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 32, 661-668.
- Moore,V.A., Dunnion,D.J., Brown,T., Irwin,W.J., und Akhtar,S. (1997). Interaction of oligonucleotide-conjugates with the dipeptide transporter system in Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1223-1228.
- Napoli,C., Lemieux,C., und Jorgensen,R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Ng,K.K., Drickamer,K., und Weis,W.I. (1996). Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. *J Biol. Chem.* 271, 663-674.
- Ngo,H., Tschudi,C., Gull,K., und Ullu,E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14687-14692.
- Novina,C.D., Murray,M.F., Dykxhoorn,D.M., Beresford,P.J., Riess,J., Lee,S.K., Collman,R.G., Lieberman,J., Shankar,P., und Sharp,P.A. (2002). siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.* 8, 681-686.
- Novina,C.D. und Sharp,P.A. (2004). The RNAi revolution. *Nature* 430, 161-164.
- Oehlke,J., Birth,P., Klauschenz,E., Wiesner,B., Beyermann,M., Oksche,A., und Bienert,M. (2002). Cellular uptake of antisense oligonucleotides after complexing or conjugation with cell-penetrating model peptides. *Eur. J Biochem.* 269, 4025-4032.
- Okamura,K., Ishizuka,A., Siomi,H., und Siomi,M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* 18, 1655-1666.

- Park,H.H. und Wu,H. (2004). Gauging length: recognition of small interfering RNAs. *Structure*. 12, 172-173.
- Pooga,M., Soomets,U., Hallbrink,M., Valkna,A., Saar,K., Rezaei,K., Kahl,U., Hao,J.X., Xu,X.J., Wiesenfeld-Hallin,Z., Hokfelt,T., Bartfai,T., und Langel,U. (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels und modify pain transmission in vivo. *Nat. Biotechnol.* 16, 857-861.
- Provost,P., Dishart,D., Doucet,J., Friendewey,D., Samuelsson,B., und Radmark,O. (2002). Ribonuclease activity und RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.* 21, 5864-5874.
- Rand,T.A., Ginalski,K., Grishin,N.V., und Wang,X. (2004). Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Rand,T.A., Petersen,S., Du,F., und Wang,X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621-629.
- Randall,G., Grakoui,A., und Rice,C.M. (2003). Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 235-240.
- Rensen,P.C., de Vruhe,R.L., Kuiper,J., Bijsterbosch,M.K., Biessen,E.A., und van Berkel,T.J. (2001). Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. *NAR*2001_29_e100 47, 251-276.
- Rensen,P.C., Sliedregt,L.A., Ferns,M., Kieviet,E., van Rossenberg,S.M., van Leeuwen,S.H., van Berkel,T.J., und Biessen,E.A. (2001). Determination of the upper size limit for uptake und processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro und in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 37577-37584.
- Rio,S., Beau,J.M., und Jacquinet,J.C. (1993). Total synthesis of the carbohydrate-protein linkage region common to several mammalian proteoglycans. *Carbohydr. Res* 244, 295-313.
- Rogers,F.A., Manoharan,M., Rabinovitch,P., Ward,D.C., und Glazer,P.M. (2004). Peptide conjugates for chromosomal gene targeting by triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 32, 6595-6604.
- Romo,D., Rzasa,R.M., Sun,L., Shea,H.A., Park,K., Langenhan,J.M., Liu,J.O., und Akhiezer,A. (1998). Total Synthesis und Immunosuppressive Activity of (-)-Pateamine A und Related Compounds: Implementation of a β -Lactam-Based Macrocyclization. *J Am Chem. Soc.* 103-148.
- Rothbard,J.B., Kreider,E., VanDeusen,C.L., Wright,L., Wylie,B.L., und Wender,P.A. (2002). Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake. *J. Med. Chem.* 45, 3612-3618.
- Rump,E.T., de Vruhe,R.L., Manoharan,M., Waarlo,I.H., van Veghel,R., Biessen,E.A., van Berkel,T.J., und Bijsterbosch,M.K. (2000). Modification of the plasma clearance und liver uptake of steroid ester-conjugated oligodeoxynucleotides by association with (lactosylated) low-density lipoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1407-1416.

Safinya, C.R. (2001). Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *11*, 440-448.

Sanchez, A.A. und Newmark, P.A. (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 5049-5054.

Scherer, L.J. und Rossi, J.J. (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.* *21*, 1457-1465.

Scherr, M., Battmer, K., Winkler, T., Heidenreich, O., Ganser, A., und Eder, M. (2003). Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood* *101*, 1566-1569.

Schmidt, R.R. und Kinzy, W. (1994). Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: the trichloroacetimidate method. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* *50*, 21-123.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., und Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.

Schwarz, D.S., Tomari, Y., und Zamore, P.D. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr. Biol.* *14*, 787-791.

Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., und Dowdy, S.F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* *285*, 1569-1572.

Schwarze, S.R., Hruska, K.A., und Dowdy, S.F. (2000). Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol.* *10*, 290-295.

Shea, R.G., Marsters, J.C., und Bischofberger, N. (1990). Synthesis, hybridization properties and antiviral activity of lipid-oligodeoxynucleotide conjugates. *Nucleic Acids Res* *18*, 3777-3783.

Shiraishi, T., Bendifallah, N., und Nielsen, P.E. (2006). Cellular delivery of polyheteroaromate-peptide nucleic acid conjugates mediated by cationic lipids. *Nature Protocols* *1*, 1-4.

Shiraishi, T., Pankratova, S., und Nielsen, P.E. (2005). Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat und oligoarginine peptides. *Chem. Biol.* *12*, 923-929.

Simeoni, F., Morris, M.C., Heitz, F., und Divita, G. (2003). Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* *31*, 2717-2724.

Sioud, M. (2004). Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 22-28.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., und Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute und its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434-1437.

- Sorensen,D.R., Leirdal,M., und Sioud,M. (2003). Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J. Mol. Biol.* 327, 761-766.
- Soutschek,J., Akinc,A., Bramlage,B., Charisse,K., Constien,R., Donoghue,M., Elbashir,S., Geick,A., Hadwiger,P., Harborth,J., John,M., Kesavan,V., Lavine,G., Pandey,R.K., Racie,T., Rajeev,K.G., Rohl,I., Toudjarska,I., Wang,G., Wuschko,S., Bumcrot,D., Koteliensky,V., Limmer,S., Manoharan,M., und Vornlocher,H.P. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178.
- Spiess,M. und Lodish,H.F. (1985). Sequence of a second human asialoglycoprotein receptor: conservation of two receptor genes during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 6465-6469.
- Stevenson,M. (2003). Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 851-858.
- Stoorvogel,W., Geuze,H.J., und Strous,G.J. (1987). Sorting of endocytosed transferrin and asialoglycoprotein occurs immediately after internalization in HepG2 cells. *J Cell Biol.* 104, 1261-1268.
- Szoka Jr., F. C., Xu, Y., und Zelphati, O. How are nucleic acids released in cells from cationic lipid-nucleic acid complexes? *Adv.Drug Deliv.Rev.* 1997.
- Templeton,N.S. (2002). Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. *Biosci. Rep.* 22, 283-295.
- Tomari,Y., Matranga,C., Haley,B., Martinez,N., und Zamore,P.D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377-1380.
- Towbin,H., Staehelin,T., und Gordon,J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149.
- Turner,J.J., Arzumanov,A.A., und Gait,M.J. (2005a). Synthesis, cellular uptake und HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Res* 33, 27-42.
- Turner,J.J., Ivanova,G.D., Verbeure,B., Williams,D., Arzumanov,A.A., Abes,S., Lebleu,B., und Gait,M.J. (2005b). Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res* 33, 6837-6849.
- Ui-Tei,K., Naito,Y., und Saigo,K. (2006). Essential Notes Regarding the Design of Functional siRNAs for Efficient Mammalian RNAi. *J Biomed. Biotechnol.* 2006, 65052.
- Van Der Krol,A.R., Mur,L.A., Beld,M., Mol,J.N., und Stuitje,A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299.

- Van Lenten, L. und Ashwell, G. (1972). The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. Development of a quantitative inhibition assay. *J Biol. Chem.* **247**, 4633-4640.
- Vives, E. und Lebleu, B. Selective Coupling of a Highly Basic Peptide to an Oligonucleotide. *Tetrahedron Letters* **38**, 1183-1186. 1997. 9-1-0097.
- Wang, Q. und Carmichael, G.G. (2004). Effects of length und location on the cellular response to double-stranded RNA. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 432-52, table.
- Wang, S., Lee, R.J., Cauchon, G., Gorenstein, D.G., und Low, P.S. (1995). Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 3318-3322.
- Wargelius, A., Ellingsen, S., und Fjose, A. (1999). Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 156-161.
- Weigel, P.H. (1980). Characterization of the asialoglycoprotein receptor on isolated rat hepatocytes. *J Biol. Chem.* **255**, 6111-6120.
- Wianny, F. und Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biol* **2**, 70-75.
- Wincott, F., DiRenzo, A., Shaffer, C., Grimm, S., Tracz, D., Workman, C., Sweedler, D., Gonzalez, C., Scaringe, S., und Usman, N. (1995). Synthesis, deprotection, analysis und purification of RNA und ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 2677-2684.
- Xu, Q., Barany, G., Hammer, R.P., und Musier-Forsyth, K. (1996). Efficient introduction of phosphorothioates into RNA oligonucleotides by 3-ethoxy-1,2,4-dithiazoline-5-one (EDITH). *Nucleic Acids Res.* **24**, 3643-3644.
- Yang, Z., Lin, W., und Yu, B. (2000). Rearrangement of sugar 1,2-orthoesters to glycosidic products: a mechanistic implication. *Carbohydr. Res* **329**, 879-884.
- Yuan, Y.R., Pei, Y., Chen, H.Y., Tuschl, T., und Patel, D.J. (2006). A potential protein-RNA recognition event along the RISC-loading pathway from the structure of a *aeolicus* argonaute with externally bound siRNA. *Structure.* **14**, 1557-1565.
- Zamore, P.D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 746-750.
- Zamore, P.D. und Aronin, N. (2003). siRNAs knock down hepatitis. *Nat. Med.* **9**, 266-267.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., und Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E., und Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.* **21**, 5875-5885.

Zhang,H., Kolb,F.A., Jaskiewicz,L., Westhof,E., und Filipowicz,W. (2004). Single processing center models for human Dicer und bacterial RNase III. *Cell* 118, 57-68.

Zhang,L., Yang,N., Mohamed-Hadley,A., Rubin,S.C., und Coukos,G. (2003). Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF und anti-angiogenesis gene therapy of cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 1169-1178.

Zimmermann,T.S., Lee,A.C., Akinc,A., Bramlage,B., Bumcrot,D., Fedoruk,M.N., Harborth,J., Heyes,J.A., Jeffs,L.B., John,M., Judge,A.D., Lam,K., McClintock,K., Nechev,L.V., Palmer,L.R., Racie,T., Rohl,I., Seiffert,S., Shanmugam,S., Sood,V., Soutschek,J., Toudjarska,I., Wheat,A.J., Yaworski,E., Zedalis,W., Koteliensky,V., Manoharan,M., Vornlocher,H.P., und MacLachlan,I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 10, 1-4.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 29. November 2006

Andrea Claudia Forst